

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**BIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN
INMUNOLÓGICA DE DOS ALERGENOS
PRINCIPALES DEL POLEN DE OLIVO:
Ole e 1 Y Ole e 9**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sonia Huecas Gayo

Bajo la dirección de las doctoras

Rosalía Rodríguez García
Mayte Villalba Díaz

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1830-2

INTRODUCCIÓN	1
LA RESPUESTA ALÉRGICA	
INDIVIDUOS ATÓPICOS	3
Factores genéticos	3
Otros factores de riesgo	4
Adyuvantes	5
ALERGENOS	6
Características moleculares	6
Reactividad cruzada	8
Alergenos con actividad bioquímica	8
<u>Aeroalergenos</u>	8
<u>Alergenos de alimentos</u>	10
<i>Proteínas de defensa -1,3-glucanasas</i>	12
POLINOSIS	13
El polen	13
Polinosis en el área mediterránea	14
ALERGIA AL POLEN DE OLIVO	14
ALERGENOS DEL POLEN DE OLIVO	16
Reacciones cruzadas en la familia <i>Oleaceae</i>	19
ALERGENOS RECOMBINANTES. VENTAJAS Y APLICACIONES	
Determinación de epítomos B y T	21
Determinación de la estructura tridimensional	22
Diagnóstico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	22
Inmunoterapia de las reacciones alérgicas	23
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>Pichia pastoris</i>	24
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
MATERIALES	27
Microorganismos	27
<u>Cepas de <i>Escherichia coli</i></u>	27
<u>Cepas de <i>Pichia pastoris</i></u>	27
Vectores plasmídicos	27
<u>Vectores para la manipulación del DNA</u>	27
<u>Vectores para la producción de proteínas en <i>P. pastoris</i></u>	27
Medios de cultivo	28
<u>Cultivo de <i>E. coli</i></u>	28
<u>Cultivo de <i>P. pastoris</i></u>	28
Pólenes	29
Sueros	29

Soluciones de uso general	29
MÉTODOS	30
 AISLAMIENTO DE RNA	30
 NORTHERN BLOT	30
 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA	31
Electroforesis de ácidos nucleicos	31
Electroforesis de RNA	31
Electroforesis de DNA	31
En geles de agarosa	31
En geles de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes	31
Aislamiento de fragmentos de DNA	31
Purificación de fragmentos de DNA de tamaño superior a 1.5 kb	31
Purificación de fragmentos de DNA con un tamaño inferior a 1.5 kb	32
Aislamiento de DNA plasmídico	32
Reacciones de modificación y digestión de DNA	32
 CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DE DNA	32
Síntesis de cDNA	32
Amplificación de DNA por PCR	33
Amplificación de gen de Ole e 1	33
Amplificación del mutante no glicosilado de Ole e 1	33
Amplificación del gen de Ole e 9	34
Clonaje de fragmentos de DNA	35
Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	35
Secuenciación de DNA	36
 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>Pichia pastoris</i>	36
Preparación de células competentes y transformación de <i>P. pastoris</i>	36
Transformación por acetato de litio	36
Transformación por Polietilenglicol	37
Determinación del fenotipo Mut ^s o Mut ⁺	37
Producción de proteínas por secreción extracelular	38
Expresión en cepas Mut ^s	38
Expresión en cepas Mut ⁺	38
 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	38
Purificación de rOle e 1 y mOle e 1	38

Purificación de rOle e 9	39
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NATURALES	39
Preparación de extractos de pólenes	39
Purificación de Ole e1	39
Purificación de Ole e 9	40
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	40
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)	40
Transferencia electroforética	41
Análisis de aminoácidos	42
Espectrometría de masas	42
Detección de azúcares	42
Desglicosilación enzimática	43
Digestión con tripsina y separación de péptidos	43
Secuenciación automática de péptidos y proteínas	43
BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍAS Y PREDICCIONES TEÓRICAS	43
Masa molecular y punto isoelectrico	43
Predicción de regiones antigénicas	43
Búsqueda de homología de secuencia y alineamiento con proteínas homólogas	44
Estructura secundaria	44
Estructura terciaria	44
CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	44
Espectros de absorción ultravioleta	44
Espectros de dicroísmo circular	44
Curvas de desnaturalización térmica	45
Espectros de emisión de fluorescencia	45
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE Ole e 9	45
CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA	46
Enzimoimmunoassay (ELISA) indirecto	46
Ensayos de inhibición	47
Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa	47
Prueba cutánea (Prick test)	48
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
EXPRESIÓN DEL ALERGENO Ole e 1 EN <i>Pichia pastoris</i>	49
Clonaje y expresión de Ole e 1	49
Aislamiento del alergen recombinante rOle e 1	52

Caracterización molecular de rOle e 1	54
Caracterización espectroscópica de rOle e 1	57
Caracterización inmunológica de rOle e 1	58
Pruebas cutáneas (Prick test)	60
Determinación preliminar de la estructura de Ole e 1 por cristalización y difracción de rayos X	63
EXPRESIÓN EN <i>Pichia pastoris</i> DE UN MUTANTE NO GLICOSILADO DE Ole e 1	66
Amplificación, clonaje y expresión de mOle e 1	67
Aislamiento del alérgeno mutante de Ole e 1 (mOle e 1)	68
Caracterización molecular de mOle e 1	69
Caracterización espectroscópica de mOle e 1	70
Estabilidad térmica	71
Caracterización inmunológica de mOle e 1	73
ALERGENOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN EL POLEN DE OLIVO	77
Detección de un nuevo alérgeno	77
Aislamiento y purificación	78
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE Ole e 9	80
Análisis de la glicosilación	80
Criterios de pureza	80
Análisis en PAGE-SDS	81
Determinación de la masa molecular	82
Composición de aminoácidos	83
Determinación parcial de la estructura primaria de Ole e 9	84
CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DE Ole e 9	86
Homología de secuencia	92
Predicción de estructura secundaria	96
Predicción de antigenicidad e hidrofilia	97
ANÁLISIS FUNCIONAL DE Ole e 9: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA -1,3-glucanasa	98
MODELIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE Ole e 9	102
CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE Ole e 9	103
Localización de regiones inmunodominantes en Ole e 9	107
Presencia de proteínas homólogas en otros pólenes	108
<u>Ensayos de inhibición</u>	108
<u>Análisis por inmunotransferencia</u>	109
<u>Northern blot</u>	111
ESPECIFICIDAD DE TEJIDO DEL mRNA DE Ole e 9	113
EXPRESIÓN DEL ALERGENO Ole e 9 EN <i>Pichia pastoris</i>	114

Clonaje y expresión de Ole e 9	115
Aislamiento del alérgeno recombinante rOle e 9	119
Caracterización molecular de rOle e 9	120
Caracterización inmunológica de rOle e 9	121
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFÍA	126

LA RESPUESTA ALÉRGICA

La respuesta alérgica ha sido definida como una respuesta excesiva y alterada del sistema inmune frente a determinados antígenos, por lo general inocuos, llamados alergenos. Las reacciones alérgicas o de hipersensibilidad, se pueden clasificar siguiendo distintos criterios:

- 1.- Tipo de respuesta inmune celular.
- 2.- Tiempo que tardan en aparecer los síntomas. Si éstos se producen unos minutos después de la exposición al antígeno se denomina *reacción inmediata*; si comienzan después de varias horas es una *reacción tardía*, y si aparecen una vez han pasado varios días, se denomina *reacción retardada*.
- 3.- Patrón clínico de la enfermedad. Según este criterio, las reacciones de hipersensibilidad pueden clasificarse como *Tipo I-IV*. Las reacciones de *Tipo I* dependen de la interacción entre el antígeno y los anticuerpos IgE unidos a mastocitos. La causa de dicha reacción es la liberación de histaminas y otros mediadores químicos y los síntomas asociados ocurren inmediatamente. Las reacciones de *Tipo II* son reacciones citotóxicas entre el antígeno unido a células y los anticuerpos circulantes IgM o IgG. En el *Tipo III* se incluyen aquellas reacciones inmunes complejas entre el antígeno circulante y anticuerpos IgG. El *Tipo IV* es una reacción inmune celular mediada por linfocitos, que reaccionan con células que contienen el antígeno, vía citoquinas.

Según estas clasificaciones, la alergia atópica es una reacción de hipersensibilidad inmediata de Tipo I.

Los procesos alérgicos están experimentando una creciente incidencia clínica en la población mundial, habiéndose estimado que afectan al 20% de los habitantes de los países desarrollados [Hopkin, 1997]. Aunque las bases moleculares y celulares de estos procesos no se conocen con exactitud, la secuencia de acontecimientos en el desarrollo de la hipersensibilidad se puede considerar dividida en dos etapas: sensibilización y provocación (figura 1).

Etapas de sensibilización. Cuando se produce la entrada del antígeno (alergeno), bien sea inhalado, ingerido o inyectado, es presentado al sistema inmune que lo reconoce como extraño, lo que desencadena la producción de anticuerpos IgE. Las moléculas alergénicas atraviesan las mucosas y acceden a las estructuras linfáticas transportadas por unas células denominadas en su conjunto Células Presentadoras de Antígeno (APCs). Dichas células se han identificado como macrófagos, monocitos y células dendríticas. En los individuos que sufren procesos alérgicos, estas células se encuentran en grandes cantidades en las mucosas, en los ganglios linfáticos y en todas aquellas zonas en que existe una alta concentración de antígenos. Las moléculas del alergeno sufren un doble reconocimiento. Por un lado las células B en reposo reconocen al antígeno intacto gracias

a los receptores que poseen en su membrana (inmunoglobulinas) resultando activadas (respuesta independiente de linfocitos T). Por otro, las APCs procesan las moléculas antigénicas y las presentan en la superficie celular en forma de fragmentos peptídicos asociados a las moléculas del sistema de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II o HLA-II en humanos). Las APCs presentan el alérgeno procesado a los linfocitos T en reposo promoviendo la diferenciación de éstos a células colaboradoras de tipo 2 (Th2) las cuales producen, entre otras citoquinas, la interleuquina 4 (IL-4). Esta interleuquina actúa sobre los linfocitos B induciendo su activación y diferenciación a células plasmáticas productoras de IgE (respuesta dependiente de linfocitos T). Los receptores de IgE de alta afinidad (Fc RI) están presentes en la superficie de mastocitos y basófilos y su concentración es alta en los individuos atópicos con elevados niveles de IgE en plasma. De esta forma los Fc RI de mastocitos y basófilos están ocupados de forma permanente por las IgE y, por tanto, listos para reaccionar en el próximo contacto con el alérgeno.

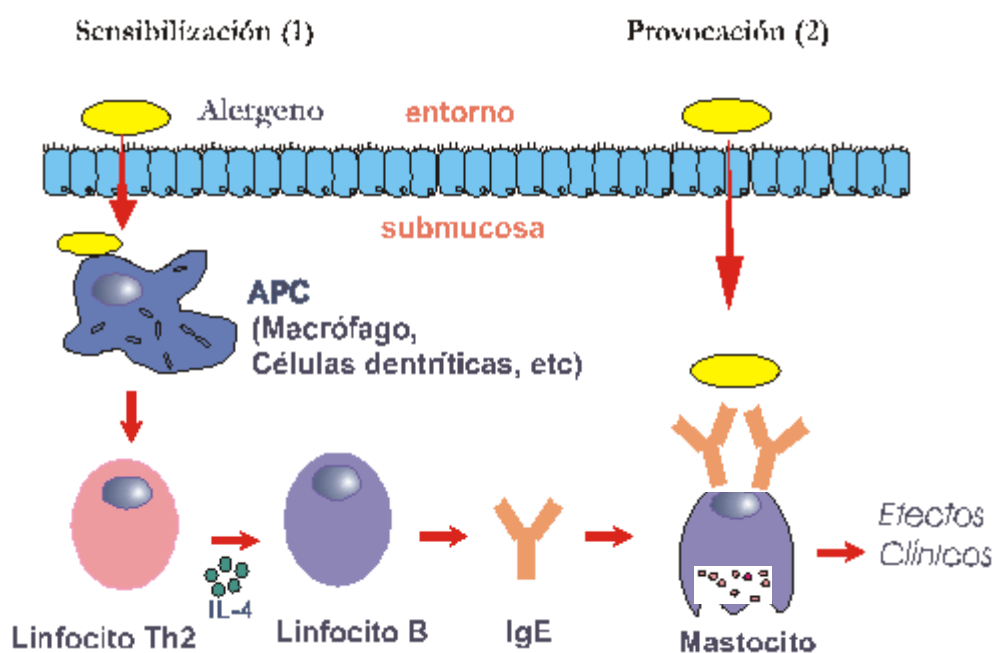


Figura 1: Representación esquemática de la secuencia de acontecimientos en la hipersensibilidad inmediata.

Etapas de provocación. Una nueva exposición al alérgeno da lugar a que éste entre de nuevo en contacto con las células del sistema inmune que poseen en su superficie IgE específicas frente a ese alérgeno. La unión del mismo a las IgE provoca en la membrana de mastocitos y basófilos el entrecruzamiento de los receptores Fc RI. Este hecho desencadena

la desgranulación de estas células, y la consiguiente liberación, e incluso síntesis, de gran variedad de mediadores tales como la histamina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, factor activador de plaquetas, serotonina, citoquinas y algunas proteasas. La acción de estos mediadores sobre diversos tejidos es la responsable de la sintomatología asociada a la alergia: rinitis, asma bronquial, conjuntivitis, urticaria, eczema, dermatitis atópica y trastornos gastrointestinales. En su forma más severa puede llegar a ocasionar la muerte del individuo por obstrucción de las vías respiratorias y colapso cardiovascular (shock anafiláctico).

Unos minutos después de entrar en contacto con el alergeno, y como consecuencia de la desgranulación de los mastocitos, se desencadena la respuesta alérgica temprana. Cuando la exposición al alergeno ha sido grande, la fase temprana es seguida por una fase tardía provocada por la acumulación de eosinófilos y otras células inflamatorias atraídas hacia la zona de la reacción alérgica por factores quimiotácticos [Carlson y col., 1992]. A este proceso se le considera el principal responsable de la hiperreactividad inespecífica. Dicha hiperreactividad se traduce en la aparición de síntomas frente a numerosos irritantes directos como el frío, los productos contaminantes, el tabaco, etc. y la persistencia de los mismos más allá de la exposición al alergeno.

INDIVIDUOS ATÓPICOS

Los individuos atópicos son aquellos que presentan una predisposición hereditaria a producir niveles elevados de anticuerpos IgE en respuesta a la exposición de pequeñas cantidades del alergeno, moléculas por otra parte inocuas para una mayor parte de la población. Sin embargo, la manifestación de la alergia parece ser el resultado no sólo de factores genéticos sino también de factores medioambientales, como son la dieta o niveles altos de los alergenos en el ambiente, así como la exposición a sustancias adyuvantes que potenciarían el proceso de sensibilización.

Factores genéticos

Las enfermedades alérgicas presentan un componente familiar que sugiere la existencia de una base genética [Ballesta y col., 1998]. Estudios realizados con hermanos gemelos han demostrado que la probabilidad de que ambos presenten una enfermedad alérgica es mucho mayor en hermanos monocigóticos que en hermanos dicigóticos y que el patrón hereditario es del 75% [Duffy y col., 1990]. Estudios sobre la prevalencia del asma en familias han apuntado hacia la influencia de pocos genes con un fuerte efecto (oligogenia) más que hacia la influencia de muchos genes con efecto aditivo (poligenia) [Jenkins y col., 1997]. El análisis del factor hereditario de los niveles de IgE en suero, que es el principal marcador del estado atópico, se ha asociado también a genes de fuerte efecto

[Blumenthal y col., 1981].

Se ha sugerido que hay al menos dos tipos de mecanismos implicados en la inmunogenética de las enfermedades alérgicas: el control genético de los niveles totales de IgE y el de la respuesta inmune específica. Cookson y col. [1989] dedujeron que la atopía era transmitida de forma dominante, existiendo un único locus de susceptibilidad principal, localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11q). Sin embargo, la asociación entre el cromosoma 11 y la atopía no se ha confirmado en trabajos posteriores [Lympany y col., 1992]. Últimamente se ha planteado que varios genes que codifican distintas citoquinas podrían ser los principales candidatos en el control de la respuesta de IgE. Quizás el más relevante en esta regulación sería el gen de la IL-4, que junto con el de IL-5 e IL-3, regularían la producción de IgE de forma no dependiente del antígeno [Marsh y col., 1994]. Dichos genes mapean muy próximos. En cuanto a la genética de la respuesta inmune específica, los diferentes estudios se han centrado en el análisis de los puntos claves del reconocimiento del antígeno a través del receptor de las células T. En este sentido, la utilización de las distintas técnicas de tipificación en estudios de población de individuos alérgicos ha permitido establecer asociaciones entre los antígenos de HLA-II y la respuesta IgE específica a distintos alérgenos. Dicha relación se ha descrito, por ejemplo, entre el alérgeno Amb a V y HLA-DR2/Dw2 [Marsh y col., 1982], Lol p I y Lol p II con HLA-DR3 [Freidhoff y col., 1988] y Ole e 1 con los haplotipos DR7 y DQ2 [Cárdaba y col., 1996]. Sin embargo, en otros estudios no se ha encontrado ninguna relación [Li y col., 1995; Ebner y col., 1995a]. Debido a la discrepancia en los resultados existentes hasta la fecha, la relación entre genes concretos y la patología atópica no está claramente establecida.

Otros estudios epidemiológicos han puesto en evidencia que el fenotipo de la madre ejerce una influencia directa sobre la herencia del asma y la alergia [Moffatt y Cookson, 1998]. Así, la presencia de elevados niveles de IgE en sangre y prueba cutánea positiva en niños se ha asociado en todos los casos con madres atópicas.

Otros factores de riesgo

Estudios sobre la prevalencia de enfermedades alérgicas dependiendo del sexo y edad han demostrado que hay una predominancia dentro del sexo masculino, encontrándose más personas afectadas con edades comprendidas entre los 15 y 30 años y viéndose que los síntomas desaparecen con la edad.

El mes de nacimiento y la edad de comienzo de ingesta de un determinado alimento, también parece influir en el desarrollo de la alergia, ya que durante los primeros meses de vida, cuando el sistema inmune está inmaduro, existe un mayor riesgo de sensibilización frente a alérgenos presentes en la comida o en el ambiente. Incluso algunos estudios

apuntan al hecho de que los niños nacidos en la época de polinización tienen mayor probabilidad de sufrir alergia al polen durante su vida [Holt y col., 1990].

Las enfermedades atópicas también se han asociado con las infecciones que sufren los niños en la infancia, y con los cambios en la flora bacteriana del sistema digestivo asociada con una forma de vida “más limpia” [Bjorksten, 1999]. Se ha argumentado que el sistema inmune debe ser entrenado igual que nuestro sistema nervioso. Y, puesto que actualmente se trata farmacológicamente y de forma inmediata las infecciones bacterianas y virales, se puede producir una desviación inmune siendo el resultado la alergia y otras enfermedades inmunológicas.

La leche materna también juega un papel importante en el desarrollo del sistema inmune. Hay estudios que evidencian que la alimentación con leche materna protege del desarrollo de enfermedades alérgicas [Saarinen y Kajosaari, 1995] así como otras infecciones respiratorias y gastrointestinales [Pabst, 1997]. Además con esta alimentación se reduce la exposición a los alérgenos que contiene la leche de vaca.

Adyuvantes

En la búsqueda a una respuesta a porqué durante las últimas décadas se ha producido un aumento en la incidencia de las enfermedades alérgicas, se han realizado estudios que responsabilizan a determinados factores como son la contaminación ambiental y el humo del tabaco, como potenciadores del proceso de sensibilización alérgica.

Aunque se ha demostrado que la contaminación ambiental puede aumentar la respuesta alérgica potenciando sus síntomas durante la exposición a los alérgenos [von Mutis, 1999], no hay tanta evidencia de que influya en el aumento del número de personas alérgicas. Como ejemplo tenemos los estudios posteriores a la reunificación realizados entre la población alemana, en los que se ha comprobado que el número de personas alérgicas era menor en las ciudades del este, donde los niveles de contaminación eran mayores que en las ciudades del oeste [von Mutis y col, 1994; Nowak y col., 1996]. Otros estudios realizados en distintas poblaciones o áreas geográficas han corroborado estas observaciones [Braback y col., 1994; Braback y col., 1995]. Estos hallazgos sugerían que pueden ser las partículas asociadas con el aumento del tráfico de coches, característico de las ciudades del oeste, las causantes del aumento del número de alérgicos. Por ejemplo, existen ciertos estudios que demuestran que las partículas resultantes de la combustión de la gasolina tienen la capacidad de absorber y, por tanto, concentrar en su superficie moléculas alérgicas, actuando como transportadores y aumentando su acumulación en el pulmón [Knox y col., 1997]. El efecto derivado de este proceso es el incremento tanto de la dosis como, posiblemente, de la antigenicidad de los alérgenos. Otros estudios apuntan a que la exposición al diesel después de la exposición al antígeno conlleva un

aumento en la expresión de las citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) [Díaz-Sánchez y col., 1997].

Por otra parte, se ha comprobado que la exposición pasiva al humo del tabaco aumenta la probabilidad de sufrir enfermedades respiratorias, tales como bronquitis y neumonía, así como una disminución de la capacidad pulmonar y un aumento significativo en la sintomatología clínica de los niños asmáticos. Actualmente hay numerosos estudios que evidencian que la exposición al humo del tabaco es, además, un factor de riesgo para la aparición de nuevos casos de individuos con enfermedades alérgicas que no habían presentado síntomas anteriormente [Cook y col., 1999].

Por tanto, los factores medioambientales pueden jugar un papel importante en el desarrollo y en la sintomatología de las personas predispuestas genéticamente a padecer enfermedades alérgicas.

ALERGENOS

Características moleculares

Los alergenitos son antígenos, la mayoría de ellos de naturaleza proteica, capaces de provocar una reacción alérgica de Tipo I, mediada por IgE. Sin embargo, todavía no se ha podido dar respuesta a la pregunta de por qué algunas proteínas son alergenitos y otras no. Todos los alergenitos descritos hasta la fecha poseen características físicas y moleculares distintas, no siendo ninguna de ellas atribuibles de forma exclusiva a su naturaleza alérgica. Aún así, se pueden encontrar ciertas propiedades comunes. Son proteínas o glicoproteínas con un tamaño comprendido entre 5 y 70 kDa. El límite inferior lo determina el mínimo grado de complejidad molecular necesario para que sea una molécula inmunogénica y el límite superior la capacidad para atravesar la membrana de las mucosas [Mygind y col., 1996]. Además, han de ser proteínas muy solubles, y estables en los fluidos corporales. Así, vemos que la capacidad de un material biológico para inducir alergia guarda relación directa con su grado de accesibilidad al organismo. Por ello, los alergenitos más comúnmente asociados a enfermedades atópicas son los inhalados (aeroalergenitos) y los ingeridos (alergenitos alimentarios). Otras importantes fuentes biológicas de alergenitos actúan por inyección o por contacto, como son el veneno de insectos y el látex (tabla 1).

El patrón alérgico de los extractos biológicos puede ser muy simple conteniendo un número pequeño de alergenitos como ocurre en los venenos de avispas, o bien muy complejo, encontrándose un elevado número de alergenitos, como por ejemplo en el polen de olivo, que se pueden clasificar como **principales** o **secundarios** en función de la frecuencia con la que son reconocidos por una población de pacientes alérgicos. Así, un alérgeno es principal cuando es reconocido por más del 50% de los pacientes [King y col., 1964], en otro caso se califica de secundario. En cada fuente alérgica se pueden encontrar

uno o más alérgenos principales. Los alérgenos conocidos reciben un nombre sistemático siguiendo la nomenclatura de la IUIS (International Union of Immunology Societies) [King y col., 1994].

Tabla 1- Principales fuentes biológicas de alérgenos.

Alergenos aerotransportados		
<u>Pólenes</u>	Gramíneas	<i>Phleum pratense, Lolium perenne, Poa pratensis, Dactylis glomerata, Cynodon dactylon</i>
	Arbustos	<i>Chenopodium album, Parietaria judaica, Salsola pestifer, Salsola kali, Ambrosia artemisifolia, Mercurialis annua, Artemisia vulgaris, Helianthus annuus</i>
	Árboles	<i>Betula verrucosa, Alnus glutinosa, Carpinus betulus, Corylus avellana, Cupressus arizonica, Juniperus oxicedrus, Olea europaea</i>
<u>Ácaros</u>		<i>Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Blomia tropicalis, Lepidoglyphus destructor, Acarus siro</i>
<u>Animales</u>	Perro	<i>Cannis domesticus</i>
	Gato	<i>Felix domesticus</i>
	Ratón	<i>Mus musculus</i>
	Caballo	<i>Equus caballus</i>
<u>Hongos y levaduras</u>		<i>Alternaria alternata, Aspergillus fumigatus, Cladosporium herbarum, Candida albicans</i>
<u>Insectos</u>	Cucaracha	<i>Blatella germanica</i>
	Mosquito	<i>Chironomus thumi thumi</i>
<u>Semillas</u>	Harinas	<i>Secale cereale, Hordeum vulgare, Triticum aestivum</i>
Alergenos inyectados		
<u>Veneno de insectos</u>	Véspidos	<i>Apis mellifera, Vespula vulgaris, Polistes annularis</i>
	Hormigas	<i>Solenopsis invicta</i>
Alergenos ocupacionales	Látex	<i>Hevea brasiliensis</i>
Alergenos ingeridos (alimentos)		Leche, huevos, pescado, marisco, frutos secos (nueces, cacahuetes y otros), frutas (manzana, melocotón, kiwi, melón y otras), derivados de cereales, semillas, especias (ajo, canela, mostaza y otras).

Una molécula alergénica contiene un número determinado de **epítomos** (determinantes antigénicos), constituidos por un número variable de residuos que oscila, generalmente, entre 8 y 15, y que pueden ser continuos o discontinuos, dependiendo de si están formando una secuencia continua en la estructura primaria de la proteína o si su proximidad está determinada por la estructura tridimensional de la misma. De forma que cada paciente puede responder a distintos alérgenos contenidos en una misma fuente biológica [Ansari y col., 1987; Rodríguez y col., 1998], y también reconocer distintos epítomos (dentro de la misma molécula) diferentes de los que reconozca otro paciente [Ebner y col., 1993; Rogers y col., 1994]. Esta variación en la respuesta parece estar determinada genéticamente. No obstante, la respuesta de cada individuo parece ser constante en el tiempo. Aunque la respuesta específica de IgE puede cambiar cuantitativamente, no se han observado cambios cualitativos [Ipsen y col., 1988].

Reactividad cruzada

La reactividad cruzada es un proceso por el cual las IgEs de un paciente producidas frente a un determinado alérgeno pueden ser reactivas frente a otro alérgeno con el que el individuo no ha entrado previamente en contacto. Para que se produzca reactividad cruzada entre dos o más alérgenos, es necesario que haya una similitud estructural entre ellos, luego todas aquellas proteínas homólogas, presentes en distintas fuentes biológicas, serían candidatas para presentar reactividad cruzada. En la reactividad cruzada pueden estar implicados determinados epítomos que comparten distintos alérgenos sin que la similitud estructural en el resto de la proteína sea elevada. Como ejemplo, encontramos los alérgenos que unen calcio en los que se ha descrito un epítopo en el sitio de unión al Ca^{2+} . La significación clínica de esta respuesta no es siempre la misma, puede variar desde producir síntomas clínicos al primer contacto hasta no producir ninguna sintomatología pese a ser reconocido por las IgE del individuo alérgico.

A las proteínas con un alto nivel de similitud estructural o funcional, que se encuentran en diferentes fuentes alergénicas y que son responsables de fenómenos de reactividad cruzada, se les denomina **panalérgenos**.

Alérgenos con actividad bioquímica

Aeroalérgenos

Las fuentes biológicas más comunes de aeroalérgenos son pólenes de árboles, arbustos y gramíneas, ácaros, esporas de hongos y epitelios de animales domésticos.

Gracias a los avances en las técnicas bioquímicas y de biología molecular, en la actualidad se conoce la secuencia completa de más de 100 aeroalérgenos de distintas fuentes. El estudio de éstos ha llevado a demostrar que muchos poseen actividad biológica,

llegándose incluso a sugerir que esta actividad podría contribuir a las propiedades inmunogénicas de los alergenios. Tal es el caso del alergenio Der p 1, del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, cuya actividad cisteínproteasa parece estar directamente relacionada con el aumento de la permeabilidad de las membranas del epitelio, facilitándose así la captación del alergenio [Herbert y col., 1995]. También se ha comprobado que Der p 1 es capaz de degradar los receptores de baja afinidad de IgE (CD23) y los receptores de IL-2 (CD25) [Hewitt y col., 1995; Schulz y col., 1995] provocando una falta de regulación en la respuesta alérgica y aumentando la producción de IgE [Shakib y col., 1998]. Resulta, por tanto, interesante comprobar que muchos alergenios tienen actividad proteolítica.

Tabla 2- Resumen de los principales grupos de aeroalergenios con actividad bioquímica conocida.

Actividad bioquímica		Alergenios
<u>Enzimas hidrolíticas</u>		
Proteasas	Serinproteasas	Der p 3, Der f 3, Der p 6, Der f 6, Der p 9
	Cisteinproteasas	Der f 1, Der p 1
	Aspartatoproteasas	Bla g 2
Glicosidasas	Amilasas	Der p 4, Asp o 2
	Polimetilgalacturonidasa	Cry j 2, Phl p 13
Ribonucleasas		Hor v 5, Lol p5, Phl p 5, Dac g 5, Asp f 1
<u>Enzimas no hidrolíticas</u>		
Aldehído deshidrogenasa		Alt a 2
Glutación transferasa		Der p 8
Peptato liasas		Amb a 1, Amb a 2, Cry j 1
<u>Inhibidores enzimáticos</u>		
Inhibidores de tripsina		Ory s 1, Ric c 1, BM AI-1, BDAI-1
Inhibidores de -amilasa		CM16, WMAI-1
<u>Proteínas de transporte</u>		
Citocromo C		Lol p 10, Poa p 10, Cyn d 10
Lipocalinas		Bla g 4, Mus m 1, Rat n 2
<u>Proteínas reguladoras</u>		
Profilinas		Ole e 2, Bet v 2,
Tropomiosinas		Der p 10, Der f 10, Lep d 10
Alergenios ligantes de Ca ²⁺		Ole e 3, Ole e 8, Bet v 3, Jun o 2, Cyn d 7,
		Aln g 4, Phl p 7

Los alérgenos se pueden agrupar en función de sus distintas actividades biológicas bien demostrada experimentalmente o por su homología con proteínas de función conocida [Stewart y Thompson, 1996]. Estos grupos incluyen enzimas hidrolíticas y no-hidrolíticas, inhibidores enzimáticos, proteínas implicadas en el transporte y proteínas reguladoras (tabla 2). En cualquier caso, existen muchos alérgenos principales cuya actividad bioquímica se desconoce. Entre ellos se encuentran algunos alérgenos del polen de árboles, principalmente del grupo 1.

Alérgenos de alimentos

En primer lugar, y antes de abordar el análisis de las características particulares de los alérgenos implicados en la alergia a alimentos, es importante distinguir dos formas de alergia (clase 1 y clase 2) basándose en los síntomas clínicos, las características de los alérgenos y los mecanismos inmunológicos que se producen. En la clase 1, en la que el proceso de sensibilización se produce en el tracto intestinal, cabe destacar la resistencia a la digestión gástrica de estos alérgenos [Astwood y col., 1996]. Afecta principalmente a niños y las fuentes más importantes de alérgenos son la leche de vaca, los huevos y las legumbres. En la clase 2 se incluyen principalmente adultos que desarrollan alergia como consecuencia de una sensibilización previa a aeroalérgenos. Por tanto, la base inmunológica que subyace a este tipo de alergia alimentaria es el fenómeno de la reactividad cruzada, que puede manifestarse clínicamente o resultar irrelevante [Bircher y col., 1994; Ebner y col., 1995b]. La alergia a alimentos ha adquirido una mayor relevancia durante la última década debido al incremento en el número de afectados por alergias a aeroalérgenos.

Como consecuencia de que hayan aumentado el número de personas afectadas por alergias alimentarias, durante los últimos años se ha aumentado, también, el estudio de los alérgenos de alimentos vegetales, lo que ha llevado a la conclusión de que muchos de ellos son proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas, [Breiteneder y Ebner, 2000; Hoffman-Sommergruber, 2000] llamadas PR- proteins (Pathogenesis-Related Proteins), cuya expresión se induce como respuesta a la invasión de patógenos, a determinadas situaciones de estrés u otros daños. Estas proteínas se han clasificado en 14 familias. Algunas de estas proteínas se expresan de forma constitutiva en algunos órganos o durante el desarrollo de las plantas, no siendo estrictamente proteínas de defensa, a éstas se les denomina proteínas similares a las de defensa frente a patógenos “PR-like proteins”. Como ejemplo, de alérgenos homólogos a proteínas de defensa encontramos las quitinasas (PR-3; PR-4), proteínas similares a taumatinas (thaumatin-like proteins) (PR-5) o las LTPs (Lipid Transfer Proteins) (PR-14) que son proteínas implicadas en el transporte de lípidos de los liposomas a la mitocondria (tabla 3). Las enzimas α -1,3-glucanasa (familia PR-2) [Alenius y col., 1995] junto con las quitinasas [Blanco y col., 1999] han sido relacionadas, recientemente, como posibles responsables de la reactividad cruzada existente entre látex

y frutas como el plátano, el kiwi, el aguacate y la castaña [Brehler y col., 1997; Yagami y col., 1998].

Tabla 3- Alergenos de alimentos homólogos a proteínas de defensa.

Clasificación	Alergeno/Fuente alergénica	Referencia
-1,3-glucanasa (tipo PR-2)	Frutas/vegetales	Yagami y col., 1998
Quitinasas (tipo PR-3; PR-4)	Pers a 1/ aguacate	Sowka y col., 1998a
Proteínas tipo taumatinas	Pru av 2 / cereza	Inschlag y col., 1998
(tipo PR-5)	Mal d 2 / manzana	Hsieh y col., 1995
	P23 / pimienta	Jensen- Jarolim y col., 1998
Proteínas de resistencia a	Mal d 1/ manzana	Vanek-Krebitz y col., 1995
enfermedades de la planta	Pru av 1 / cereza	Scheurer y col., 1997
(tipo PR-10)	Pru ar 1 / albaricoque	Pühringer, AF020784*
	Pyr c 1 / pera	Karamloo, AF057030*
	Api g 1/ apio	Breiteneder y col., 1995
	Dau c 1/ zanahoria	Hoffmann y col., 1999
	pcPR / perejil; pSTH / patata	Hoffman y col., 1997
LTPs (tipo PR-14)	Pru p 3 / melocotón	Pastorello y col., 1999a
	Mal d 3 / manzana	Pastorello y col., 1999b

* EMBL/GenBank accession number

Aparte de los alergenos con homología a proteínas de defensa, se conoce la función biológica de otros alergenos de alimentos. Muchos de ellos tienen la misma función ya descrita para algunos aeroalergenos. Entre ellos cabe destacar los alergenos pertenecientes a la familia de inhibidores de proteasas y α -amilasas como, por ejemplo, Sec c 1 [García-Casado y col., 1996], Hor v 1 [Mena y col., 1992], CM16 [Barber y col., 1989] y RAP [Izumi y col., 1992], alergenos de centeno, cebada, trigo y arroz, respectivamente. Las profilinas, reconocidas como panalergenos en plantas [Valenta y col., 1992], también se encuentran en frutas como la manzana, pera, zanahoria, apio, patata, tomate, calabaza y cacahuete [van-Ree y col., 1992; Petersen y col., 1996; Fritsch y col., 1997; Kleber-Janke y col., 1999]. Las proteínas de almacenamiento en semillas como son la albúmina 2S y las globulinas son alergénicas en la mostaza, Sin a 1 [Menéndez-Arias y col., 1988] y Bra j 1 [Monsalve y col., 1993] y en el cacahuete, Ara h 1 [Burks y col., 1991]. Por último, también hay descritos alergenos con actividad proteolítica en frutas como el kiwi, Act c 1 [Pastorello y col., 1998]. Durante los últimos años se han descrito muchos alergenos procedentes de distintas fuentes con la misma actividad bioquímica y causantes de reactividad cruzada entre las mismas.

Proteínas de defensa (PR 2): -1,3-glucanasa

Las enzimas endo- -1,3-glucanasas (PR-2) pertenecen a la familia 17 de la superfamilia de las enzimas hidrolíticas glicosil-hidrolasas. Puesto que con la infección de plantas se induce la expresión de los genes de -1,3-glucanasas, y ya que éstas tienen la capacidad para hidrolizar glucopolímeros -(1-3) presentes en la pared celular de hongos, se propuso que estas enzimas, junto con otras enzimas hidrolíticas como son las quitinasas, forman parte de los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos. Con posterioridad se han descubierto genes de -1,3-glucanasas que se expresan durante procesos del desarrollo de plantas sanas [Gruner y Pfitzner, 1994; Regalado y Ricardo, 1996], como la germinación [Casacuberta y col., 1992], la senescencia [Hanfrey y col., 1996], la floración [Lotan y col., 1989; Ori y col., 1990; Cote y col., 1991; van Eldik y col., 1996], la maduración de la fruta [Hinton y col., 1980; Peumans y col., 2000] y el crecimiento del tubo polínico [Roggen y col., 1969; Ori y col., 1990]. Por tanto, estas enzimas podrían tener funciones específicas durante los procesos normales de desarrollo de las plantas. Más recientemente se les ha atribuido, también, actividad alérgica.

Las -1,3-glucanasas son proteínas abundantes y ampliamente distribuidas en plantas que se caracterizan por presentar isoformas y varían en su punto isoeléctrico, en su tamaño, en su localización celular y tisular y en su patrón de regulación. Así, se han dividido en cuatro grandes grupos basándose en éstas diferencias [Ward y col., 1991; van Eldik y col., 1996] (tabla 5). Las proteínas de la Clase I tienen un punto isoeléctrico básico y se localizan en las vacuolas de las células vegetales. Su RNA se acumula en hojas maduras y en raíces como respuesta al ataque de patógenos [Linthorst y col., 1990]. La Clase II son proteínas de punto isoeléctrico ácido que son secretadas al espacio extracelular. Estas enzimas, al igual que las de la clase I, no se encuentran en hojas sanas y se acumulan como respuesta a procesos patogénicos, su actividad enzimática es inferior a las de la clase I y parece que su función es liberar otras sustancias intermediarias que contribuyan en la actividad antifúngica, más que atacar directamente a los hongos que infectan la planta [Ward y col., 1991]. Las -1,3-glucanasas que pertenecen a la Clase III son proteínas ácidas y están diferenciadas de la clase II debido a ausencia de homología de secuencia entre ellas, aunque también se inducen durante procesos infecciosos [Payne y col., 1990]. Finalmente, se han descrito dos -1,3-glucanasas ácidas, sp41a y sp41b, que se acumulan en el estilo del tabaco pero que no se inducen por patógenos [van Eldik y col., 1996]. Aunque estas proteínas tienen una identidad del 80% con las -1,3-glucanasas de clase II, se les ha puesto en otra clase (Clase IV) por no presentar un patrón de expresión relacionado con procesos patogénicos.

Tabla 5: Clasificación de las enzimas α -1,3-glucanasas

Clase	Masa molecular (kDa)	pI	Localización celular	Inducción por patógenos
I	33-34	básico	vacuolar	Si
II	35-41	ácido	secretadas	Si
III	35	ácido	secretadas	Si
IV	35	ácido	secretadas	No

POLINOSIS

La polinosis o alergia a pólenes, tiene una gran relevancia clínica por tratarse, junto con los ácaros del polvo, de la alergia más frecuente. Los órganos que se ven afectados son la conjuntiva y las vías respiratorias superiores por lo que la manifestación clínica clásica la constituyen los ataques de rinitis y conjuntivitis alérgica (fiebre del heno), siendo también frecuente la aparición de asma. La incidencia de la polinosis está muy influida por los factores ambientales (principalmente los que caracterizan la zona fitogeográfica tomada en consideración) y por las características del polen.

El polen

El grano de polen es la célula sexual masculina necesaria para la reproducción de las plantas con semillas (espermatofitas). El polen se forma en los sacos polínicos (microesporangio) de las anteras por división meiótica de una célula madre de la microspora. El grano de polen es la microspora madura donde tienen lugar los procesos de maduración que comienzan con una división mitótica que origina dos células denominadas vegetativa y generativa. El núcleo de esta última se divide seguidamente para dar lugar a dos núcleos generativos. El núcleo vegetativo es responsable del crecimiento del tubo polínico hacia la célula huevo o megaspora, mientras que el núcleo generativo está implicado en la fertilización y formación de la semilla.

El grano de polen maduro se encuentra rodeado por dos paredes. La interna o *intina* está compuesta por celulosa y pectina, elementos que conforman el tubo polínico en el proceso de fertilización. La capa externa o *exina* está compuesta por esporopolenina, un politerpeno muy resistente a la degradación química. Los granos de polen de distintas especies se pueden distinguir por sus características morfológicas como son la polaridad, la forma, el tamaño, la distribución y forma de los orificios en la pared externa y la estructura y relieve de la pared [Moore y col., 1991]. También se pueden distinguir dos tipos de pólenes, en función del proceso de polinización en el cual estén implicados. **Entomófilos**, son aquellos pólenes transportados por insectos por lo que raramente causan polinosis, los granos de polen son grandes (hasta 100 μ m), esculpidos en su superficie y

recubiertos por una sustancia denominada polenquita [Hesse, 1991] de carácter pegajoso que facilita la adhesión de los granos de polen a las patas de los insectos que lo transportan. **Anemófilos**, son los transportados por el viento por lo que poseen características que facilitan dicho transporte: son granos pequeños 15-50 μ m, ligeros y en general de superficie más lisa [Emberlin, 1997]. Estas propiedades facilitan, a su vez, el acceso a las vías respiratorias y la penetración en las mucosas de los pacientes provocando la reacción alérgica. Además estos pólenes se liberan en enormes concentraciones a la atmósfera para asegurar una polinización eficaz.

Polinosis en el área mediterránea

Las características geográficas y climáticas del área mediterránea promueven el crecimiento de una vegetación típica con la presencia de varias especies alergénicas, tales como *Parietaria judaica* (*Urticaceae*), *Olea europaea* (*Oleaceae*), varios miembros de la familia *Cupressaceae*, junto con *Artemisia* y varias especies pertenecientes a la familia de las gramíneas [D Amato y Liccardi, 1994].

El análisis del contenido en polen de muestras aerobiológicas recogidas en varias ciudades mediterráneas permite identificar tres estaciones polínicas:

- 1.- Invierno (diciembre a finales de marzo), marcada por la presencia de pólenes de árboles como el ciprés (*Cupressus sempervirens*), el enebro (*Juniperus communis*), la mimosa (*Aacacia spp.*), el abedul (*Betula verrucosa*) y el avellano (*Corylus avellana*).
- 2.- Primavera y verano (abril-julio) son las estaciones más importantes desde el punto de vista alergológico, dominadas por la polinización de gramíneas, parietaria y oleáceas.
- 3.- Verano y otoño (agosto-octubre): parietaria, algunas gramíneas y otras plantas herbáceas.

Aunque las gramíneas son la principal causa de polinosis en el área mediterránea, otros pólenes como parietaria, oleáceas y, en menor medida, las cupresáceas, juegan un papel importante en esta zona. En cambio en Europa central y en las zonas atlánticas las alergias más frecuentes se dan frente a la familia betulácea, que incluye géneros como el abedul, el avellano y el aliso [Corsico, 1993].

ALERGIA AL POLEN DE OLIVO

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol longevo que ha sido cultivado por el hombre durante más de 5000 años para la explotación de su fruto, aceite y madera. Probablemente tiene sus orígenes en Asia Menor, desde donde se extendió por toda el área mediterránea. Durante el siglo XVI fue introducido en el continente americano y más recientemente (siglo XVIII y siguientes), en otras áreas con climatología parecida a la mediterránea, como son Australia y el Sur de África [Manousis y Moore, 1988].

Existen diversas especies de olivo. En España se han encontrado más de 165 variedades, incluyendo la forma silvestre denominada *Olea oleaster* [Barranco y Rallo, 1984]. Queda por elucidar si la expresión de alergenicos en cada una de estas especies del olivo es cualitativa o cuantitativamente diferente, aunque hay algunos datos que parecen indicar que existen diferencias significativas [Waysel y col., 1996].

El polen de olivo es pequeño (entre 17-21 μ m de diámetro), esferoidal, isopolar y tricolporado. El contorno ecuatorial es subtriangular y el meridional es circular o ligeramente elíptico. Posee una exina gruesa y reticulada, típica de la familia de las oleáceas (figura 2).

La polinización del olivo es entomófila, pero también es anemófila cuando la producción de polen es abundante [D Amato y col., 1988]. El periodo de polinización, aunque puede darse desde finales de enero hasta junio, dependiendo de la latitud y de las condiciones climáticas locales, suele tener lugar entre mediados de abril y finales de junio. En cualquier caso, el periodo de polinización no es muy largo, siendo su duración aproximada de unos 40 días.

La cantidad de polen producido cada año depende de varios factores climáticos, siendo también importante la “alternancia de producción”. Este fenómeno agronómico, característico del olivo y de otras especies arbóreas, depende esencialmente de la competencia entre la maduración del fruto y el desarrollo de la yema [Macchia y col., 1987]. La concentración atmosférica de polen más frecuente en el área mediterránea varía entre 100-200 granos/ m^3 , aunque se han recogido hasta 4500 granos/ m^3 en aquellas zonas donde hay grandes extensiones cultivadas de éste árbol, como Jaén en España o Apulia en Italia [Macchia y col., 1991].



Figura 2: Micrografía electrónica de un grano de polen de olivo. Método: el material fresco fue metalizado con oropaladio y fotografiado en un microscopio de barrido.

La polinosis del olivo se caracteriza por una sintomatología severa nasal y/o bronquial, variando enormemente entre las personas alérgicas en función del área geográfica y el grado de cultivo de este árbol [Bousquet y col., 1984; Giulekas y col., 1991]. Normalmente los pacientes alérgicos a olivo también lo son a otros pólenes, no siendo frecuente la monosensibilización [Liccardi y col., 1996a] aunque se han descrito pacientes monosensibles a olivo en Nápoles, caracterizándose porque sus síntomas están presentes durante todo el año sin un incremento aparente durante la época de polinización [Liccardi y col., 1996b]. Este hecho también se ha descrito en pacientes españoles [Blanco y col., 1992; Carreira y Polo, 1995].

Las principales áreas de incidencia de la polinosis al olivo son el sur de Francia, España, Italia, algunas regiones de Portugal, Grecia e Israel [Wheeler, 1992]. También se ha descrito como causa importante de alergias en algunas zonas de América del Norte como California y Arizona [Vinay y Lewis, 1986] y en Australia [Baldo y col., 1992].

En España, el olivo se distribuye preferentemente por la mitad sur, siendo muy abundante en toda Andalucía, aunque provincias como Madrid, Toledo, Teruel, Cáceres y Badajoz también poseen extensos olivares. El polen de olivo es, en términos generales, la segunda causa de polinosis en España detrás de las gramíneas, llegando a ser la primera en determinadas zonas de Andalucía como Córdoba o Jaén.

ALERGENOS DEL POLEN DE OLIVO

El patrón de componentes alergénicos (alergograma) en el polen de olivo es muy complejo, ya que contiene un elevado número de proteínas que son reconocidas por IgE de pacientes alérgicos a este polen. Los primeros estudios realizados con el fin de caracterizar los alergenios del polen de olivo describen el reconocimiento de bandas proteicas con pesos moleculares de 65, 42, 32, 19 y 17 kDa [Vela y col., 1982; Blanca y col., 1983; Lahoz y col., 1985; Lauzurica y col., 1988a]. A las bandas de 17 y 19 kDa, las reconocidas por un mayor número de sueros de pacientes alérgicos, 65% y 88% respectivamente [Wheeler y col., 1990], las denominaron antígeno Olea 1 [Lauzurica y col., 1988b].

Recientemente se ha demostrado que el patrón de reconocimiento de bandas en el extracto del polen de olivo depende del área geográfica donde viven los pacientes. Así los pacientes de Jaén o Córdoba muestran un alergograma más complejo que los pacientes de Madrid, donde los niveles de polen de olivo en la época de polinización son mucho menores que en Andalucía [Rodríguez y col., 1998].

Hasta la fecha se han identificado, purificado y caracterizado ocho alergenios en el polen de olivo que se han denominado desde Ole e 1 hasta Ole e 8 (tabla 4), según la nomenclatura de la IUIS (International Union of Immunology Societies).

Tabla 4- Alergenos del polen de olivo

Nombre	Masa molecular (kDa)	NH ₂ -terminal	Homología	Prevalencia ^(a) (%)
Ole e 1	18.5	EDVPQPPVSQ	Syr v 1, Lig v 1, LAT52, Lol p 11, Zmc13, SP1, <i>A.</i> <i>thaliana</i> , <i>B. verrucosa</i>	55-80
Ole e 2 (profilina)	16	MSWQAYVDD	Profilinas	24*
Ole e 3	9.2	ADDPQEVAEH (bloqueado)	Polcalcinas	20-25
Ole e 4	32	Bloqueado	-----	80**
Ole e 5	16	VKAVTVLNSSE	Superóxido dismutasa	35**
Ole e 6	5/10.2 ^(b)	DEAQFKDCYD	-----	10-50
Ole e 7	10.3	APSQGTVTAK	LTPs	47
Ole e 8	18.8	AANTDRNSKP	Jun o 2, TCH2	4-5

(a) valor dependiente de la población de sueros utilizada

(b) Masa molecular calculada a partir del clon/masa molecular aparente estimada por PAGE/SDS

* Determinado mediante inmunotición

** Determinado con una población de 20 personas alérgicas

Ole e 1 está considerado como el alergeno principal del polen de olivo. Se ha purificado a partir del extracto del polen de olivo [Lombardero y col., 1992] y se ha determinado su secuencia de aminoácidos mediante la degradación de Edman de los péptidos resultantes de digestiones proteolíticas [Villalba y col., 1993]. La proteína consiste en una cadena de 145 aminoácidos con una masa molecular de 16331 Da (determinado por espectrometría de masas). Contiene un grupo glicosídico unido covalentemente a la Asn-111 [De Cesare y col., 1993; Batanero y col., 1994a]. Debido a este carácter glicoproteico, presenta en PAGE-SDS un patrón complejo formado por dos bandas mayoritarias de 18.5 y 20 kDa, esta última glicosilada, y dos componentes minoritarios de 22 y 40 kDa que corresponden a una molécula con un mayor contenido en azúcares y a la forma dimérica, respectivamente. Ole e 1 contiene 6 cisteínas cuya disposición formando tres puentes disulfuro se ha resuelto recientemente [González y col., 2000].

El oligosacárido de Ole e 1 se ha aislado y purificado, lo que ha puesto de manifiesto la existencia de distintas glicoformas “complejas” y “ricas en manosas”. Así mismo, se ha demostrado que presenta actividad antigénica y alergénica, siendo capaz de provocar la liberación de histamina en los pacientes alérgicos [Batanero y col., 1994a; Batanero y col., 1999]. Por otro lado, se ha demostrado que dicho oligosacárido es

responsable de la reactividad cruzada de Ole e 1 con proteínas de fuentes biológicas no relacionadas con el olivo [Batanero y col., 1996a]. Recientemente se ha resuelto la estructura de los componentes mayoritarios de este azúcar mediante técnicas de RMN [van Ree y col., 2000].

A partir del RNA total aislado del polen de olivo, se amplificó el cDNA codificante de Ole e 1, se clonó y secuenció [Villalba y col., 1994; Lombardero y col., 1994], obteniéndose más de diez isoformas diferentes. Uno de los clones que codifica para Ole e 1 fue expresado en *E. coli*, obteniéndose como proteína de fusión unida a la enzima glutatión S-transferasa, pero el rendimiento y la solubilidad del alergen recombinante fueron bajos.

Ole e 2, profilina del olivo. Estas proteínas son una familia de proteínas ampliamente distribuidas en plantas, que han sido reconocidas como alergen no sólo en pólenes sino también en frutas y vegetales. Su ubicuidad, unido a su secuencia altamente conservada hace que hayan sido consideradas panalergen causantes de reactividad cruzada [Valenta y col., 1992].

La profilina del olivo ha sido purificada a partir del extracto de polen [Ledesma y col., 1998a] y ha sido clonada y secuenciada [Asturias y col., 1997]. Sus características moleculares e inmunológicas no difieren de las descritas para otras profilinas. Presenta una prevalencia en inmunotransferencia del 24%, pero cerca del 50% de los sueros pierden reactividad debido al SDS, luego la prevalencia real debe ser notablemente superior al 50% de los pacientes alérgicos al polen de olivo. Se ha detectado reactividad cruzada de Ole e 2 con algunas gramíneas, betuláceas y otros miembros de la familia de las oleáceas [Ledesma y col., 1998a].

Ole e 3 y **Ole e 8**, son alergen del polen de olivo pertenecientes a una familia de proteínas ligantes de Ca^{2+} con motivos estructurales *EF-hand*, consistentes en 12 residuos consecutivos y altamente conservados que forman un lazo capaz de unir iones calcio. Ole e 3 contiene dos motivos mientras que Ole e 8 posee cuatro. Esta familia de alergen, específicos de polen y ligantes de calcio de tipo EF-hand, ha sido denominada polcalcinas.

Ole e 3 es una proteína pequeña (9.2 kDa) y ácida (pI 4.2-4.3) que ha sido purificada a partir del polen donde se expresa de manera exclusiva [Batanero y col., 1996b]. No contiene aminoácidos aromáticos (Trp o Tyr), lo que ha impedido la realización de algunos estudios espectroscópicos. Tampoco contiene cisteínas en su molécula, lo que ha facilitado en gran manera la obtención del alergen recombinante en *E. coli* perfectamente plegado y con un alto rendimiento [Ledesma y col., 1998b]. Ole e 3 consiste en una cadena simple de 84 aminoácidos, que exhibe una elevada homología con otras proteínas ligantes de Ca^{2+} de pólenes de distintas especies, encontrándose reactividad cruzada entre las mismas. Tanto

para Ole e 3 como para otras polcalcinas, la unión de IgEs varía ligeramente dependiendo de la presencia o no de iones calcio unidos a la molécula.

Ole e 8 es el primer miembro descrito en plantas de una nueva familia de proteínas ligantes de Ca^{2+} con cuatro sitios de unión *EF-hand*. El alergen, que consiste en una sola cadena de 171 aminoácidos, ha sido clonado, secuenciado y expresado en *E. coli* [Ledesma y col., 2000]. Se trata, al igual que Ole e 3, de una proteína que se produce específicamente en polen y no se expresa en otros tejidos.

Ole e 4 y Ole e 5 son dos alergenitos del polen de olivo que han sido purificados y parcialmente caracterizados [Boluda y col., 1998]. Ole e 4 tiene una masa molecular de 32 kDa, está constituido por una sola cadena polipeptídica y presenta al menos tres isoformas de pI entre 4.6 y 5.1. Ole e 5 es un alergenito de 16 kDa, del cual se conocen 29 residuos de su secuencia NH_2 -terminal, donde muestra una identidad de secuencia del 65.5-79.3% con superóxido dismutasas de origen vegetal. Es un alergenito secundario ya que es reconocido por el 30% de los sueros de pacientes alérgicos.

Ole e 6 es una proteína rica en cisteínas que se ha aislado del polen y se ha determinado su secuencia aminoacídica mediante clonación del cDNA que la codifica [Batanero y col., 1997]. Se trata de una sola cadena polipeptídica de 5.8 kDa con un pI ácido. Presenta una secuencia de 50 aminoácidos con dos motivos Cys- X_3 -Cys- X_3 -Cys, no encontrándose homología con ninguna proteína presente en las bases de datos de secuencia. La prevalencia de Ole e 6 depende mucho del área geográfica variando desde el 10 hasta el 55% entre pacientes que sufren polinosis al olivo.

Ole e 7 es una LTP del polen de olivo con una masa molecular aparente de 10 kDa, que ha sido recientemente purificada y caracterizada [Tejera y col., 1999]. Mediante secuenciación del extremo NH_2 -terminal por degradación de Edman se han determinado los primeros 20 aminoácidos, encontrándose una notable heterogeneidad en la misma, hecho que se ha confirmado mediante el análisis por espectrometría de masas, el cual indica que Ole e 7 está compuesto por varias isoformas con pesos moleculares entre 9875 y 10091 Da. Ole e 7 presenta una frecuencia de reconocimiento del 47% por sueros de pacientes alérgicos a olivo, aunque este valor se ve incrementado en aquellas poblaciones que están expuestas a altos niveles de polen de olivo. La secuencia primaria parcial que se dispone de este alergenito ha permitido encontrar homología con proteínas de transferencia de lípidos (LTP) de plantas.

Reacciones cruzadas en la familia *Oleaceae*

La familia de las oleáceas incluye al menos 400 especies. Aunque de todos los pólenes producidos por esta familia es el del olivo el más alérgico, hay otras especies

tales como fresno (*Fraxinus excelsior*), aligustre (*Ligustrum vulgare*), lila (*Syringa vulgaris*) y forsitia (*Forsythia suspensa*) que contienen moléculas alergénicas.

Ya en los ochenta, hay estudios que apuntan hacia procesos de reactividad cruzada entre pólenes de la familia de las oleáceas [Bousquet y col., 1985] que han sido confirmados posteriormente [Baldo y col., 1992; Kenerman y col., 1992; Liccardi y col., 1995]. Desde entonces, se ha demostrado que hay, al menos, tres alérgenos del polen de olivo: Ole e 1, Ole e 3 y la profilina, implicados en estas reacciones cruzadas.

Baldo y col., [1992] detectaron los alérgenos homólogos a Ole e 1 en fresno, aligustre y lila. Estos resultados fueron confirmados por los estudios de Martín-Orozco y col., [1994]. Posteriormente, se han aislado y caracterizado las proteínas alergénicas homólogas a Ole e 1 de lila y aligustre: Syr v 1 y Lig v 1, respectivamente [Batanero y col., 1994b; Batanero y col., 1996c]. Se ha determinado la secuencia de varios clones del cDNA que codifica para estas proteínas y se han expresado en *E. coli* y en *Pichia pastoris*. Sin embargo, Ole e 1 no presenta reactividad cruzada con sus proteínas homólogas de pólenes de especies no relacionadas tales como maíz, centeno, tomate, arroz y *A. thaliana* (datos no publicados).

La implicación de la profilina del olivo en la reactividad cruzada con fresno, hierba del norte (*Cynodon dactylon*), abedul y maíz, se ha demostrado en los ensayos realizados por Ledesma y col., [1998a]. Por otro lado, la similitud estructural e inmunológica que Ole e 3 presenta con otros miembros de la misma familia (polcalcinas) se ha analizado mediante ensayos de inhibición en ELISA e inmunotransferencia usando un antisuero policlonal específico de Ole e 3 y estudiando los niveles de expresión del mRNA aislado de diferentes pólenes, mediante *Northern blot*. Las especies utilizadas fueron: lila, fresno abedul, artemisa, centeno, maíz, hierba del norte, ciprés y pino [Ledesma y col., 1998b].

Otros estudios han apuntado a la existencia de reactividad cruzada entre pólenes de Oleáceas y de otras especies no relacionadas filogenéticamente con ellas. Así Baldo y col., [1992] encontraron dicha reactividad entre olivo, aligustre, ballico (*Lolium perenne*) y hierba del norte. Finalmente, Schmid y col., [1993] y Wahl y col., [1993] han descrito reacciones cruzadas entre fresno y abedul, aunque no se han identificado los alérgenos responsables de tales reactividades.

ALERGENOS RECOMBINANTES. VENTAJAS Y APLICACIONES

En los últimos años, la aplicación de las técnicas de Biología Molecular a la caracterización de los alérgenos, ha mejorado notablemente el conocimiento de éstos. Ha permitido la determinación de la secuencia primaria completa de muchos de los alérgenos principales y secundarios de distintas fuentes, facilitando, por un lado, el conocimiento de su estructura química y esclareciendo muchas incógnitas planteadas como la existencia de

proteínas homólogas e incluso de epítomos comunes en fuentes próximas o alejadas filogenéticamente, y por otro lado, permitiendo la obtención de los correspondientes alergen recombinantes, con características moleculares e inmunológicas idénticas a los del alergen natural y que, por tanto, serían aplicables tanto en la diagnosis como en la terapia de las reacciones alérgicas.

Determinación de epítomos B y T

Las técnicas para la identificación de epítomos B y T en alergen se basan en el conocimiento de su estructura primaria y de su conformación. Una vez determinada la secuencia de aminoácidos es posible diseñar una serie de péptidos que contengan regiones potencialmente antigénicas o alérgicas y que cubran la secuencia de aminoácidos de la manera más completa posible. La estrategia de la obtención de estos péptidos puede hacer uso de la tecnología del DNA recombinante y ser producidos mediante el clonaje y la expresión de los fragmentos de DNA que codifican esas secuencias, o bien mediante la síntesis química de péptidos solapantes que abarquen toda la secuencia de aminoácidos.

Para la identificación de epítomos T, se evalúa la capacidad de determinados péptidos derivados del alergen para inducir respuestas proliferativas de linfocitos T. Los receptores de linfocitos T (TcR) solo reconocen el alergen una vez ha sido procesado y presentado por las APCs (mediante los HLA), por tanto, los epítomos T se encuentran continuos en la estructura primaria. Con la preparación de péptidos solapantes y el estudio de la capacidad de los mismos para estimular la proliferación de células T de pacientes alérgicos, se ha podido realizar el mapeo de epítomos T en muchos alergen [Ebner y col., 1993; Higgins y col., 1994; Bungy y col., 1994; Cárda y col., 1998; Schramm y col., 1999]. Se ha podido demostrar que el reconocimiento de epítomos T dentro de una molécula alérgica es completamente equivalente entre personas atópicas y aquellas que no lo son [Ebner y col., 1995a; van-Neerven y col., 1994].

Los epítomos B se identifican valorando su unión a IgE. Estos anticuerpos se unen a las zonas de la superficie del alergen que quedan accesibles a las células B durante el proceso de sensibilización. Las IgEs reconocen principalmente epítomos conformacionales formados, bien por aminoácidos dispuestos de forma continua en la secuencia (epítomos continuos), o bien por zonas alejadas de la molécula que, tras el plegamiento, quedan en una disposición espacial próxima en la estructura tridimensional (epítomos discontinuos). Por tanto, la determinación de la estructura tridimensional puede ser de gran ayuda para el diseño de posibles regiones inmunológicamente relevantes durante la realización del mapeo epitópico de los alergen, como ya han demostrado los estudios realizados con los alergen Bet v 1 [Gajhede y col., 1996] y la profilina del abedul [Fedorov y col., 1997a].

Los epítomos B y T son independientes unos de otros y pueden coincidir o no en la cadena polipeptídica [Mazur y col., 1990; Fehler y col., 1991].

Determinación de la estructura tridimensional

Gracias a la obtención de los alergenios como formas recombinantes producidas en grandes cantidades y con propiedades estructurales equivalentes a las de los alergenios naturales, ha sido posible la determinación de la estructura tridimensional de algunos de ellos. Para aplicar la tecnología necesaria (resonancia magnético nuclear o difracción de rayos X) se requiere una alta cantidad de una forma molecular homogénea (varios mg) y eso no es posible, en numerosas ocasiones, para los alergenios obtenidos de su fuente natural, que tan solo se pueden obtener en cantidades limitadas y en forma polimórfica. Por tanto, y aunque la estructura tridimensional del alergeno principal de Ambrosia (Amb t 5) ha sido determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) usando el alergeno natural purificado [Metzler y col., 1992], es actualmente cuando la disponibilidad de bastantes alergenios recombinantes, ha llevado a la determinación de la estructura terciaria de algunos de los más relevantes tales como Bet v 1 [Gajhede y col., 1996], Phl p 5 [Bufe y col., 1996], Phl p 2 [Fedorov y col., 1997b].

Diagnosis *in vivo* e *in vitro*

Hasta la fecha, el diagnóstico de las distintas sensibilizaciones que sufren los pacientes alérgicos se ha realizado con los extractos crudos, preparados a partir de las fuentes alérgicas, y en muy pocos casos estandarizados y de composición conocida. Estos extractos son útiles para determinar los pacientes sensibilizados a esa fuente biológica, y para medir la cantidad de IgE total del paciente frente al conjunto de alergenios presentes en ella. Pero el uso de estos extractos tiene algunos inconvenientes. Por un lado, las fuentes alérgicas y, en especial los pólenes, contienen además de los alergenios y otras proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos y pigmentos que en principio no son responsables de la sensibilización del paciente, pero que dificultan en gran manera la preparación de los extractos y su eficacia en el diagnóstico. Además, algunos alergenios que están presentes en cantidades muy pequeñas, no quedan bien representados o incluso pueden sufrir degradación durante el proceso de preparación del extracto, por lo que resulta difícil su estandarización [Bousquet y col., 1998]. Por ello, si fuera posible disponer de un número limitado de alergenios recombinantes, que retuvieran la mayoría de los epítomos presentes en los extractos alérgicos naturales, se simplificaría notablemente la diagnosis de estas afecciones. En esta línea, varios grupos han demostrado que un reducido número de alergenios recombinantes puede ser suficiente para la diagnosis de la polinosis a árboles y gramíneas [Niederberger y col., 1998a; 1998b; van Ree y col., 1998; 1999]. Además

empleando alergen recombinantes y realizando ensayos in vitro se podría determinar los alergen concretos frente a los que está sensibilizado cada paciente (alergograma), lo que podría conducir además al diseño de tratamientos terapéuticos personalizados.

Inmunoterapia de las reacciones alérgicas

La inmunoterapia clásica se basa en la administración al paciente de dosis crecientes del extracto alérgico frente al que se encuentra sensibilizado [Noon, 1991; Bousquet y col., 1998]. Aunque el mecanismo de acción de la inmunoterapia clásica no se conoce totalmente, la finalidad principal sería originar en el paciente una desensibilización progresiva a aquellos alergen que son reconocidos por sus anticuerpos IgE. Aunque este tratamiento se traduce en un elevado número de pacientes en una disminución de los síntomas clínicos, estos extractos contienen, como ya se ha mencionado, moléculas no alérgicas que pueden causar nuevas sensibilizaciones y reacciones sistémicas. Por esta razón, en los últimos años se están buscando formas alternativas de inmunoterapia. Algunos investigadores como Valenta y col., [1998a; 1999] han propuesto para una inmunoterapia más eficaz el uso de alergen recombinantes de forma que, en un tratamiento realista, a cada paciente se le inyecte una mezcla de alergen frente a los cuales produce cantidades considerables de IgE.

Otros autores han sugerido el uso de las llamadas formas hipoalérgicas (derivados no anafilácticos de alergen) para el tratamiento de la alergia. Lo ideal es que éstas no tengan capacidad para unir IgE o que la tengan muy disminuida, pero que mantengan la capacidad de estimular linfocitos T disminuyendo el peligro de posibles reacciones anafilácticas. Estas formas hipoalérgicas pueden ser bien isoformas del alergen [Ferreira y col., 1996], o formas recombinantes cuyo DNA ha sido alterado mediante mutagénesis dirigida, como se ha descrito para los alergen de ácaros del polvo, Der p 2 [Smith y col., 1996] y Der f 2 [Takai y col., 1997], o bien alergen que han sido modificados química o estructuralmente, revisado por Akdis y Blaser, [2000].

Otra alternativa sería el uso de péptidos derivados de alergen, que pudiesen disminuir el riesgo de una reacción anafiláctica. Se ha demostrado con los alergen Fel d 1 de pelo de gato [Briner y col., 1993] y Der p 1 del ácaro del polvo *D. pteronyssinus* [Hoyne y col., 1993] que, cuando se administran a ratones péptidos que contengan los principales epítomos T, se vuelven tolerantes al alergen completo.

Una última aproximación a nuevas vías de inmunoterapia, en la que los alergen recombinantes han resultado muy útiles, ha sido el estudio de las moléculas de IgG específicas de alergen. La existencia de anticuerpos IgG específicos para alergen se conoce desde hace mucho tiempo [Cooke y col., 1935]. De los estudios realizados con los alergen recombinantes Bet v 1 [Menz y col., 1996], Phl p 1, Ph p 2 y Ph p 5 [Vrtala y col.,

1996], y Der f 2 [Tame y col., 1996] se deduce que tanto los sueros de pacientes alérgicos como no alérgicos contienen IgG específicas frente a los alérgenos y de diferentes subclases. Mediante epítomos preparados por tecnología recombinante se ha visto que las IgE y las IgG de los pacientes reconocen los mismos y también distintos epítomos [Kobayashi y col., 1996]. Por tanto, IgE e IgG pueden poseer distintas afinidades por ciertos epítomos. Anticuerpos IgG1 específicos para Bet v 1 pueden bloquear la unión de IgE al alérgeno e inhibir de esta manera la liberación de histamina, por tanto los anticuerpos IgG pueden reducir los efectos anafilácticos [Vrtala y col., 1998]. Algunos autores sugieren el uso de regiones Fab recombinantes y específicas de alérgenos como terapia de bloqueo de la respuesta alérgica [Valenta y col., 1998b].

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN *Pichia pastoris*

Para conseguir la expresión de alérgenos recombinantes biológicamente activos con un alto rendimiento y grado de pureza se han utilizado distintos sistemas. En los inicios de la aplicación de las técnicas de biología molecular en alergología, los primeros alérgenos fueron clonados en la bacteria *E. coli* utilizando el vector *gt11*, sistema mediante el cual el alérgeno recombinante expresado representa un pequeño porcentaje (en torno al 1%) de las proteínas celulares. Posteriormente se han empleado nuevos vectores, así como nuevos sistemas de expresión utilizando otros organismos heterólogos tales como las levaduras, que han incrementado notoriamente no solo el rendimiento en la obtención de las proteínas recombinantes 10-50% [Mohapatra y col., 1990], sino la calidad de la proteína obtenida ya que muchas moléculas alérgicas sufren modificaciones post-transduccionales tales como la glicosilación o la formación de puentes disulfuro que son necesarias para conseguir un plegamiento correcto y ser, por tanto, biológicamente activas.

La levadura *Pichia pastoris* se ha convertido en un sistema muy utilizado para la expresión de genes heterólogos. Son varios los factores que han contribuido a ello, entre los que podemos destacar los siguientes:

- 1.- *P. pastoris* es un organismo unicelular lo que facilita su manipulación y cultivo. No obstante, es un sistema eucariota, mucho más complejo que los sistemas bacterianos y, por tanto, con toda la maquinaria proteica necesaria para lograr un correcto plegamiento y capaz de producir modificaciones post-transduccionales como son el procesamiento proteolítico, la formación de puentes disulfuro y la glicosilación. Además el manejo de este sistema es más rápido, fácil y económico que los sistemas de expresión derivados de formas eucariotas superiores, tales como las células de insectos (baculovirus) y mamíferos (CHO).
- 2.- *P. pastoris* se puede cultivar a elevada densidad celular y, generalmente, se consiguen niveles de producción muy elevados.

- 3.- Las técnicas necesarias para la manipulación genética de *P. pastoris* son muy similares a las necesarias para el manejo de *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los sistemas mejor caracterizados en la biología actual.
- 4.- Posee un promotor derivado de la enzima alcohol oxidasa I (AOXI) que resulta ser muy conveniente para la expresión controlada de genes ajenos y la selección de sus productos.
- 5.- En *P. pastoris*, las proteínas pueden ser expresadas intracelularmente, o bien secretadas al medio. Ya que *P. pastoris* secreta muy pocas proteínas endógenas y que el medio de cultivo no necesita proteínas adicionales, la secreción se puede considerar como un primer paso en la purificación. Aún así, la secreción queda limitada para proteínas que sean secretadas por su fuente natural y que, por tanto, posean una secuencia señal de transporte al exterior celular, o bien, implica el uso de una secuencia de secreción específica de la propia levadura. Una de ellas es el péptido "prepro factor " de *S. Cerevisiae*.

OBJETIVOS

El aislamiento y la caracterización molecular e inmunológica de los alergenios presentes en las distintas fuentes biológicas es muy importante, no sólo para propiciar la estandarización de los extractos utilizados en la diagnosis e inmunoterapia específica de las enfermedades alérgicas, sino para conducir a un mayor conocimiento de los procesos que median la respuesta alérgica. Dada la dificultad que supone en muchos casos el aislamiento de los alergenios de sus fuentes naturales, unido a que habitualmente dichos alergenios se encuentran a bajas concentraciones, en los últimos años se está recurriendo a la producción de los mismos mediante la expresión de sus cDNAs en sistemas heterólogos (bacterias, levaduras, etc.) que permiten la obtención de grandes cantidades de proteína homogénea y funcional.

El objetivo general de la investigación aquí planteada es contribuir a un mejor conocimiento de los alergenios del polen de olivo. Para ello se ha abordado el estudio de uno de los alergenios de alto peso molecular presentes en esta fuente alérgica, de los que apenas se tenía conocimiento hasta la fecha. Este estudio implica la purificación y la caracterización molecular de este alérgeno, el análisis de su prevalencia clínica, así como estudios de reactividad cruzada con otros pólenes. Para obtener estos fines, y dada la limitada expresión biológica de estos alergenios en el grano de polen, un objetivo primordial lo constituyó el diseño de protocolos de expresión recombinante, como es la levadura *P. pastoris*, que condujeran a la obtención, en gran cantidad, de formas recombinantes de estas proteínas con una alta calidad molecular e inmunológica, de forma que conserven intactas sus propiedades antigénicas y alérgicas. La búsqueda de un sistema nuevo de expresión es necesario sobre todo para aquellas proteínas que, como Ole e 1 alérgeno principal del polen de olivo, presentan un plegamiento complejo implicando la formación de tres puentes disulfuro y la glicosilación. Una vez puesto a punto, podría ser utilizado para la producción de los alergenios de alto peso molecular del polen de olivo.

MATERIALES

Microorganismos

Cepas de *Escherichia coli* usadas para la manipulación del DNA

DH5 α F': F' *endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^-$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI^R) *relA1* $\Delta(lacZYA-argF)$

U169 *deoR* [Φ 80 *dlac* $\Delta(lacZ)$ M15]

INV α F': F' *endA1 recA1 hsdR17* (r_k^-, m_k^+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* ϕ 80 *lacZ* Δ M15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 λ^-

Cepas de *Pichia pastoris* usadas para la expresión de proteínas

Se ha usado la cepa X-33, forma silvestre de *P. pastoris*, y la cepa GS115 que tiene una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa HIS4 (genotipo *his4*), enzima implicada en la biosíntesis de histidina. Esta alteración permite transformarla con plásmidos que contengan una copia correcta de HIS4, seleccionándose los transformantes en medio mínimo carente de histidina. Ambas cepas se pueden seleccionar con el antibiótico zeocina.

Vectores plasmídicos

Vectores para la manipulación del DNA

pUC18: Este vector de 2.7 kb contiene un gen que confiere resistencia a ampicilina, y un gen de producción de β -galactosidasa, que permite la hidrólisis del sustrato X-Gal para la selección por color de los transformantes.

pCR2.1: Se ha utilizado para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR siguiendo el protocolo del *TA cloning kit* (Invitrogen). El plásmido de 3.9 kb, contiene un gen de resistencia a ampicilina, está linearizado y posee un residuo de timidina protuberante en 5'. De esta forma, se facilita la inserción de los fragmentos amplificados por PCR que presentan una adenosina protuberante en 3'.

Vectores para la producción de proteínas en *P. pastoris*

Se han utilizado los plásmidos pPIC9 (8.0 kb), pPICZA (3.3 kb) y pPICZ α A (3.6 kb) (Invitrogen), como vectores para la integración en el genoma de *P. pastoris* de las secuencias de los genes a expresar. Son plásmidos con secuencias de autorreplicación en *E. coli*, lo que permite clonar el DNA en esta bacteria. El vector pPIC9 tiene un gen que confiere resistencia a ampicilina mientras que los vectores pPICZA y pPICZ α A tienen el gen de resistencia a zeocina. Todos tienen la región promotora y la de terminación de la transcripción del gen AOX1, entre las cuales está el sitio de clonaje, lo que permite colocar el gen a expresar bajo el control de dicho promotor. Los vectores pPIC9 y pPICZ α A contienen a continuación del promotor la señal de secreción del factor α de *Saccharomyces*

cerevisiae lo que permite obtener la proteína recombinante en el medio extracelular. pPIC9 incluye también, una copia completa del gen HIS4, que es el que se utiliza para seleccionarlo al transformar cepas *his4* de *P. pastoris*.

Medios de cultivo

Los medios que se describen a continuación se utilizaron tras esterilización en autoclave durante un ciclo de 20 min. a 120°C o mediante filtración a través de filtros de 0.22 µm.

Cultivo de *E. coli*

LB [Sambrook y col., 1989], medio empleado para el crecimiento de las cepas bacterianas con el objeto de purificar plásmidos a pequeña o gran escala. Este medio contiene bactotripton 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). Para el crecimiento de las células en medio sólido se añadió agar 15 g/l. Para la selección de transformantes de *E. coli* se añadieron a los medios: ampicilina (100 µg/ml) o zeocina (25µg/ml).

SOC, se ha utilizado para el crecimiento de células INVαF' durante el proceso de transformación. Contiene tripton 2.0% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM.

Ψ Broth, se utilizó para la obtención de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene tripton bacteriológica 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), MgSO₄ 0.4% (p/v) y KCl 10mM. El pH del medio se ajustó a 7.6 utilizando KOH 4 M.

Cultivo de *P. pastoris*

Los medios utilizados para el cultivo de la levadura *Pichia pastoris* fueron:

Crecimiento y selección de recombinante:

YPD: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa, 15 g/l de agar (para medio sólido).

YPDS: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 182.2 g/l de sorbitol, 20 g/l de D-glucosa, 15 g/l de agar

MD: 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 20 g/l de D-glucosa, 15 g/l de agar (para medio sólido)

MM: 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 5 ml de metanol, 15 g/l de agar (para medio sólido)

Producción de proteína:

BMGY: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g de peptona, 10 ml/l de glicerol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 0.1 M fosfato de potasio,

pH 6.0.

BMMY: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 5 ml/l de metanol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 0.1 M fosfato de potasio, pH 6.0

BMMH: 5 ml/l de metanol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 40 mg/l de L-histidina, 0.1 M fosfato de potasio, pH 6.0.

MMH: 5 ml/l de metanol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 40 mg/l de L-histidina.

Pólenes

Los siguientes pólenes fueron suministrados por la compañía Allergon AB (Suecia): *Artemisia vulgaris*, *Betula verrucosa*, *Cynodon dactylon*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Lolium perenne*, *Syringa vulgaris*, *Salsola kali* y *Olea europaea*. También se utilizó polen de *Olea europaea* suministrado por Biopol (Spokane, Wash).

Sueros

Se han utilizado sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo (*Olea europaea*) seleccionados en dos regiones españolas: Jaén y Madrid. Los primeros fueron amablemente suministrados por el Dr. Joaquín Quiralte de la Unidad de Alergia del Hospital Ciudad de Jaén y los segundos por los Dres. Manuel Martín-Esteban y Cristina Pascual del Departamento de Inmunoalergia del Hospital Infantil La Paz de Madrid.

Soluciones de uso general

PBS (tampón fosfato salino): NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, pH 7.4.

TAE: Tris-acetato 0.04 M (484 g/l de base Tris y 1.14 ml/l de ácido acético glacial), EDTA 1mM.

TBE: Tris-borato 0.045 M (10.8 g/l de Tris base y 5.5 g/l de ácido bórico), EDTA 1mM.

TBS (tampón Tris salino): NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, Tris 25mM, pH 7.4.

TE: Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.5-8.0.

SSC 1x: 8.765 g/l de NaCl y 4.41 g/l de citrato sódico. Ajustado el pH a 7.0 con NaOH. Esterilizado mediante autoclavado.

Tampón de aplicación de DNA (6x): azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

Tampón de aplicación de proteínas: Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v).

MÉTODOS

AISLAMIENTO DE RNA

El RNA total de polen fue aislado por el método descrito por Ullrich y col. [1980] con pequeñas modificaciones. El polen (1.0 g) se homogeneizó en un Polytron (Brinkmann Instruments) en Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, con isotiocianato de guanidinio 4 M, N-laurilsarcosinato sódico 0.5% (Fluka Chemie AG), *antifoam* 0.1% (Sigma) y 2-mercaptoetanol 140 mM. A continuación, la mezcla se centrifugó a 4500 rpm a 20°C durante 30 min. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 6000 rpm durante 10 min. Este sobrenadante se depositó sobre 3.1 ml de CsCl 5.7 M en EDTA 10 mM, y se centrifugó a 40000 rpm durante 12 h a 4 °C, con un rotor SW60 (Beckman) [Sambrook y col., 1989]. El sedimento se lavó dos veces con etanol al 70%, para eliminar el CsCl y facilitar su resuspensión. La muestra se disolvió en 100 µl de TE con SDS 0.1%, se añadieron 100 µl más de TE, y a continuación se llevó a cabo una precipitación con etanol, según los métodos descritos por Sambrook y col. [1989]. El RNA se disolvió en 50 µl de agua estéril tratada con DEPC. La concentración de RNA se estimó en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7.

El mismo proceso se siguió para aislar el RNA total de otros tejidos del olivo (tallo, hoja y fruto). En estos casos, fue necesaria una etapa adicional de homogeneización del tejido en un mortero con nitrógeno líquido.

NORTHERN BLOT

El aislamiento del RNA total de distintos tejidos del olivo (polen, tallo hoja y fruto) así como el RNA total del polen de diversas especies vegetales (*Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Betula verrucosa*, *Cynodon dactylon*, *Syringa vulgaris*, *Artemisia vulgaris*, *Lolium perenne*, *Salsola kali*) se realizó siguiendo el protocolo descrito en esta memoria. El RNA (15 µg) se sometió a electroforesis en geles de agarosa (1.2%) en presencia de formaldehído y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham), según el procedimiento habitual [Sambrook y col., 1989]. Las membranas se incubaron a 42 °C durante 30 min en la solución de hibridación *ULTRAhyb* (Ambion). Como sonda de hibridación se empleó el fragmento de 700 pb (50 ng) generado mediante PCR a partir del cDNA que codifica para Ole e 9, empleando OL9B y OL9C como oligonucleótidos cebadores. Este fragmento se marcó radiactivamente con [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, ICN Pharmaceuticals) utilizando el *kit* comercial de marcaje de DNA *Ready To Go* (Pharmacia Biotech). La sonda se desnaturalizó calentando a 90°C durante 5 minutos y se añadió a la solución de hibridación incubándose durante 16 h a 42 °C. Antes de llevar a cabo la autorradiografía de las membranas, éstas se lavaron dos veces en SSC

2x/0.1% SDS a 65 °C durante 5 min y otras dos veces en SSC 1x/0.1% SDS a 48 °C durante 15 min. Las películas de rayos X (Kodak) se expusieron a -80 °C durante el tiempo requerido.

TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA

Electroforesis de ácidos nucleicos

Electroforesis de RNA

La electroforesis para la separación de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.2% (p/v) en presencia de formaldehído al 6% (v/v). El tampón de desarrollo contenía Mops 20 mM, acetato sódico 5 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM. Las muestras de RNA se aplicaron disueltas en tampón de desarrollo con formamida al 45% (v/v), formaldehído al 16% (p/v), glicerol al 5% (v/v), azul de bromofenol al 0.02% (p/v) y bromuro de etidio 0.1 mg/ml. El RNA se visualizó por iluminación con luz ultravioleta a 312 nm [Sharp y col., 1973].

Electroforesis de DNA

Geles de agarosa

El análisis de plásmidos y fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7-2% (p/v), en tampón TAE, de acuerdo con el procedimiento descrito por Sambrook y col., [1989]. Para las electroforesis preparativas se utilizaron geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%, y el desarrollo de esta electroforesis se realizó a 4 °C. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta a 312 nm.

Geles de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes

La polimerización de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis, se llevó a cabo en un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad con separadores de 1 mm de espesor. Se prepararon geles homogéneos al 4 % de poliacrilamida de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook y col., [1989]. Las muestras de DNA se disolvieron en tampón de aplicación 6x y la electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE a una intensidad de corriente por gel de 100v durante 2 h. Las bandas de DNA se detectaron mediante la tinción del gel con una solución acuosa de azul de metileno al 0.01 % (p/v).

Aislamiento de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa o de geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Se utilizaron distintos métodos dependiendo del tamaño del DNA.

Purificación de fragmentos de DNA de tamaño superior a 1.5 kb

a) Utilizando el *kit Gene clean kit* (BIO 101). Para ello, el DNA se separó en geles de

agarosa 0.7% (p/v), en tampón TAE, y se identificaron las bandas mediante tinción con bromuro de etidio. Para purificar el fragmento de interés, se recortó la banda a partir de la agarosa que lo contenía y se siguieron las instrucciones del fabricante. Al final el DNA se resuspende en un volumen adecuado de agua o TE.

b) Para plásmidos con un tamaño superior a 4 kb, las muestras se aplicaron en geles de poliacrilamida al 4% (p/v). En este caso se recortaron también, las bandas de interés y, una vez troceadas, se introdujeron en una punta de pipeta de 1 ml sellada en su punta inferior y con lana de vidrio en el fondo. Se añadieron 400 µl de agua y se dejó agitando a 37 °C durante 16 h. Tras la incubación, se cortó la punta sellada y el DNA se eluyó mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min y se precipitó mediante la adición de 1/10 (v/v) de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol enfriado a -20 °C. Posteriormente, se lavó el DNA precipitado con etanol al 70% (v/v) frío y se resuspendió en un volumen conveniente de agua o TE.

Purificación de fragmentos de DNA con un tamaño inferior a 1.5 kb

Estos fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa (1-2 %) de bajo punto de fusión usando el método descrito en el *kit Wizard PCR preps* (Promega).

Aislamiento de DNA plasmídico

Para el aislamiento de pequeñas cantidades de DNA plasmídico (3-5 µg) se usó el *kit Wizard MiniPreps* (Promega). Para ello, se partía de cultivos bacterianos en 5 ml de LB (con el antibiótico correspondiente). Para el aislamiento de mayores cantidades de DNA plasmídico (200-400 µg) se empleó el *kit Wizard Maxipreps* (Promega) partiendo de cultivos celulares de 500 ml de LB.

Reacciones de modificación y digestión de DNA

Las reacciones de modificación del DNA con enzimas tales como la T4 DNA polimerasa, polinucleótido quinasa y las diversas endonucleasas de restricción utilizadas, se realizaron en las condiciones de temperatura y fuerza iónica óptimas para cada enzima. En cada caso se utilizó la mezcla de reacción proporcionada por el fabricante, y en los casos necesarios, se añadió RNasa A (0.5 mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA 1 mg/ml). Posteriormente, las enzimas fueron inactivadas con un tratamiento de 10 min a 65°C.

CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DE DNA

Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 2.5 µg de RNA total utilizando como cebador un oligo dT y la enzima transcriptasa inversa *Superscript II* (Gibco) y siguiendo las instrucciones del *kit SMART RACE cDNA amplification* (Clontech).

Amplificación de DNA por PCR

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp System 2400 (Applied biosystemPE). Los componentes y las condiciones de cada reacción fueron los recomendados para cada enzima variándose el numero de ciclos empleados (25-35) y la temperatura de hibridación en función del cebador específico utilizado (42- 55°C).

Amplificación del gen de Ole e 1

La región codificante de Ole e 1 (clon 3c) [Villalba y col., 1994] se amplificó mediante PCR usando la polimerasa DynaZyme (Finnzymes Oy, Espoo, Finland). Como molde se usó el plásmido pGEX-2T/Olee1, en el cual se había introducido previamente el gen para su expresión en bacteria, y dos oligonucleótidos no degenerados: rOL1-1 y rOL1-2 (tabla 6) que hibridan con la región 5' y 3', respectivamente, de la región codificante de Ole e 1. El oligonucleótido 5' incluye un sitio de restricción *XhoI* y parte de la secuencia del prepro péptido factor α que permite la fusión de la región codificante de la proteína a continuación de dicha secuencia presente en el plásmido pPIC9. El oligonucleótido 3' incluye el codon de parada y un sitio de restricción *EcoRI*.

Tabla 6- Secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de amplificación por PCR de rOle e 1 y mOle e 1

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
rOL1-1	5'CGTCTCGAGAAAAGAGAGGATGTTCCGC3' <i>XhoI</i>	EDVPQP (1-5)
rOL1-2	5'GCGAATTCTCACATGTTGGGCGGGTA3' <i>EcoRI</i> stop	YPPNM (141-145)
Factor-seq.	5' GCACAAATAACGGGTTATTGT 3'	-----
3'AOX1	5'GACTGGTTCGAATTGACAAGC3'	-----
mOL1-1	5'ATACTCAACACAGTACAAGGCACCACA3'	ILNTVQGTT(106-114)
mOL1-2	5'TGTGGTGCCTTGTACTGTGTTGAGTAT3'	ILNTVQGTT(106-114)

En negrita se destaca el codon que codifica para Gln

Amplificación del mutante no glicosilado de Ole e 1

La amplificación de la forma mutante de Ole e 1 se realizó mediante tres etapas de PCR. Como molde se usó el plásmido pPIC9/Olee1 y los cebadores inespecíficos: Factor-seq y 3'AOX1, ambos complementarios de la región que flanquea el gen de Ole e 1 en el plásmido pPIC9, y mOL1-1 y mOL1-2, cebadores específicos *sense* y *antisense* de la misma zona del DNA que incluyen la mutación de Asn por Gln, eliminando así el sitio de glicosilación (tabla 6). En las dos primeras reacciones de PCR se obtuvo la primera mitad de la molécula con los cebadores Factor-seq y mOL1-2 y la segunda mitad de la misma con

los cebadores 3'AOX1 y mOL1-1. Para obtener la secuencia completa se utilizaron los fragmentos obtenidos anteriormente como molde y como cebadores rOL1-1 y rOL1-2.

En todas las reacciones de PCR, llevadas a cabo para obtener el mutante no glicosilado de Ole e 1 se utilizó la enzima *AmpliTaq* polimerasa (Applied biosystemsPE).
Amplificación del gen de Ole e 9

Para la amplificación de la secuencia completa de Ole e 9 fueron necesarias varias etapas de PCR. En todas ellas se usó como molde el cDNA total de polen de olivo y la enzima *Advantage Taq* polimerasa (Clontech).

Tabla 7- Secuencia de los oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de amplificación por PCR de Ole e 9.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
OL9A	5'cggaattcRTARTTDATRTTNCCNGT3' (sense) <i>EcoRI</i>	TGNINY (385-390)
OL9B	5'ccgctcgagACNGGNAAYATHAAYTAY3' (antisense)	TGNINY (385-390)
OL9C	5'ACNGTNCAYGCNATGGCNGT3' (sense)	TVHAMAV (160-167)
OL9D	5'CACGGAGGAGACTCCAATGAAGTT3' (sense)	HGGDSNEV (273-280)
OL9E	5'AGGTGCATCATTTGCACTCTGGAA3' (antisense)	FQSANDAP (192-199)
OL9F	5'TGCCAATGTATCAGGCGTTGGCTG3' (antisense)	QPTPDTLA (213-220)
OL9G	5'GTGATAGGATTCGACAATGGCGAT3' (sense)	VIGFDNGD (80-87)
OL9H	5'GGTGACACAATGAAGGCATTGCTT3' (sense)	GDTMKALL (183-190)
NTC-OL9	5'gtctcgagATGGCTGCAAATGTGCAAACA3' (sense) <i>XhoI</i>	MAAIVQT (1-7)
NT-OL9	5'gtctcgagaaaagaCAATCATTTTTGGGA3' (sense) <i>XhoI</i>	QSFLG (27-31)
CT-OL9	5'ctcgccgccgTCAGTTACTGCCACTGGG3' (antisense) <i>NotI</i>	PSGSN (456-460)
SMART-II	5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG3'	-----
3'CDS	5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ 3'	-----

R: A/G, D: G/A/T, N: A/C/G/T, Y: C/T, H: A/T/C.

En minúscula se representa la región no codificante de los oligonucleótidos. Los números entre paréntesis corresponden a las posiciones de los aminoácidos utilizados para diseñarlos en la estructura primaria de la proteína.

El extremo 3'-terminal se amplificó usando el cebador OL9B y un oligonucleótido no específico 3'CDS, utilizado para la síntesis del cDNA. Con los cebadores OL9C y

OL9A se obtuvo la secuencia de una región interna. Basándose en la secuencia de nucleótidos obtenida después de estos dos pasos de PCR, se diseñaron otros tres oligonucleótidos no degenerados: OL9D, OL9E y OL9F. El extremo amino-terminal se amplificó usando los cebadores OL9E y OL9F junto con otro cebador no específico SMART-II, también utilizado para la síntesis de cDNA. El oligonucleótido OL9D fue utilizado para confirmar la secuencia del extremo carboxilo-terminal. OL9G y OL9H se emplearon como cebadores, exclusivamente, para secuenciar. Para obtener el gen completo de Ole e 9, se utilizaron otros tres nuevos oligonucleótidos. Dos de ellos correspondientes al extremo amino-terminal, que incluyen el sitio de restricción *Xho*I: NTC-OL9 y NT-OL9 (este último no incluye la región codificante del péptido señal) y otro correspondiente al extremo carboxilo-terminal CT-OL9, que incluye un sitio de restricción *Not*I. Todos los oligonucleótidos están representados en la tabla 7.

Clonaje de fragmentos de DNA

Los fragmentos obtenidos mediante PCR, se clonaron en primer lugar en un vector (pUC18 o pCR2.1) para proceder a su secuenciación. Comprobada la secuencia del DNA, se clonaron en los diferentes vectores de expresión para proceder a su posterior transformación en la cepa adecuada. La ligación en el pUC18 se realizó utilizando la enzima DNA ligasa del bacteriofago T4. La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y se mantuvo a 16 °C durante 16 horas.

Cuando los fragmentos obtenidos tras el PCR, se clonaron en el plásmido pCR2.1, la reacción se incubó a 14 °C durante 16 horas en presencia de la enzima T4 DNA ligasa, siguiendo las instrucciones del manual *TA Cloning* (Clontech).

Transformación de células competentes de *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* DH5 α F' fueron transformadas según Villalba y col. [1994], añadiendo el DNA plasmídico con el que se deseaba transformar (1-100 ng de DNA) y facilitándose la entrada del DNA mediante un choque térmico por incubación a 37 °C, durante 4 minutos, y el enfriamiento posterior en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 4 volúmenes de Ψ Broth y se incubó la suspensión celular a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, se plaquearon diferentes volúmenes en placas de LB con el antibiótico correspondiente y se incubaron de 12 a 18 h.

Cuando se usaron las células INV α F' se siguió un protocolo muy similar con ligeras modificaciones, suministrado por el *kit TA Cloning* (Clontech).

La selección de colonias positivas se realizó analizando el tamaño del plásmido. Después de lisar las colonias con 40 μ l de tampón de lisis (Tris 1 M, EDTA 0.5 M, NaOH 10 N y SDS 20%), la mezcla se neutralizó con 5 μ l de HCl 1 N, y se añadieron 5 μ l de

tampón de aplicación 6x. Se congeló a -80 °C durante 15 minutos y mediante centrifugación en frío durante 10 minutos, se sedimentó el SDS y la mayoría del DNA cromosómico. El sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico se analiza por electroforesis en geles de agarosa, distinguiéndose los plásmidos con inserto por su diferente movilidad electroforética con respecto a los controles sin inserto.

Secuenciación de DNA

La secuenciación del DNA de los diversos plásmidos recombinantes se realizó de forma automática en el servicio de secuenciación de la UCM. En el proceso de secuenciación se empleó el sistema ABI PRISM (Perkin Elmer) con la DNA polimerasa Ampli Taq FS, que carece de actividad exonucleasa y que tiene una mutación en el dominio polimerasa, lo que permite una menor discriminación frente a dNTPs respecto a la enzima original. La mezcla de reacción se preparó utilizando el protocolo comercial “ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction”. La reacción se basa en el método de terminación de cadena por didesoxirribonucleótidos [Sanger y col. 1977], en este caso los cuatro terminadores de la reacción están marcados con otros tantos fluorocromos distintos. Una vez desarrollada la electroforesis de los fragmentos de DNA, un láser excita a los fluoróforos y la emisión producida por éstos es recogida en el secuenciador que interpreta la señal y la asigna a un determinado nucleótido.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *PICHLIA PASTORIS*

Preparación de células competentes y transformación de *P. pastoris*

Transformación por acetato de litio

Este protocolo, descrito por Gietz y Schiestl [1991], se basa en el uso de acetato de litio para transformar células GS115 con los plásmidos recombinantes pPIC9/Olee1 y pPIC9/mOlee1, previamente linearizados con la enzima de restricción *Bgl*II.

Se inocularon 5 ml de YPD con células frescas de *P. pastoris* GS115, y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Este precultivo se utilizó para inocular 50 ml de YPD a una densidad de 5×10^{10} células/ml (DO_{600} de 0.1). El cultivo se incubó a 30°C hasta cuadruplicar la densidad celular. Se recogieron entonces las células mediante una centrifugación a 3000 xg durante 5 minutos, se lavaron con 25 ml de agua y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. A continuación las células se resuspendieron en 1 ml de LiAcO 100 mM, se centrifugaron durante 30 segundos y se resuspendieron de nuevo en 400 µl de LiAcO 100 mM, 50 µl de esta suspensión de células se utilizaron para cada transformación. Se centrifugaron los tubos, eliminado el sobrenadante y sobre el sedimento de células se añadieron 240 µl de PEG 3350 al 50%, 36 µl de LiAcO 1.0 M, 25 µl de ssDNA de esperma de salmón (2 mg/ml previamente hervido durante 5 min y enfriado en hielo) y 50 µl de

agua, conteniendo el DNA con el que queremos transformar (0.1 a 10 μg , generalmente se usaron 2 μg). Los tubos se agitaron vigorosamente para mezclarlo todo y se incubaron a 30 °C durante 30 min. Después se dio un choque térmico a 42 °C durante 20 min. en baño de agua y se centrifugaron a 6000 rpm durante 30s. Por último las células se resuspendieron en 200 μl de agua y se sembraron en placas de medio MD, que se incubaron a 30 °C hasta observar colonias.

Transformación por polietilenglicol

Este método de transformación es el que se usó para transformar células X-33 con el plásmido pPICZ/Olee9, previamente linearizado con la enzima *SacI*. Se ha seguido el protocolo que proporciona Invitrogen, con pequeñas modificaciones.

Para la preparación de células competentes se partió de un cultivo celular de 10 ml en YPD a una DO_{600} de 0.1, que se incubó hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.5 y 0.8. Se recogieron las células por centrifugación (500 xg, 5 min), y se lavaron con 10 ml de la solución A (sorbitol 1.0 M, bicina 10 mM, pH 8.35, etilenglicol 3% v/v), centrifugándolos de nuevo. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución A, añadiendo 55 μl de DMSO, se distribuyeron en alícuotas de 50 μl en tubos estériles de 1.5 ml y se enfriaron en un congelador de -80 °C.

En la transformación, se añadió a las células competentes 5 μg del DNA en un volumen no mayor de 5 μl , y 1 ml de solución B (PEG 1000 40%, bicina 0.2 M, pH 8.35), mezclando bien. Se incubó 1 h a 30 °C en baño de agua, mezclando cada 15 min), y se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 10 min. Se repartieron 525 μl de la mezcla a sendos tubos, se añadió 1 ml de YPD a cada uno y se incubaron a 30 °C durante 1 h. Se recogieron las células por centrifugación (3000 xg, 5 min), se resuspendieron en 500 μl de solución C (NaCl 0.15 M, bicina 10 mM, pH 8.35) y se juntaron. Se centrifugaron de nuevo, se resuspendieron en 200 μl de solución C y se extendieron en una placa de medio YPDS (100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocina), que se incubó a 30 °C hasta la aparición de colonias.

Determinación del fenotipo Mut^s o Mut^+

La transformación de cepas X-33 o GS115 con el plásmido linearizado, favorece la recombinación del gen AOX1. La mayoría de los transformantes serían Mut^+ (*Methanol utilization plus*). Sin embargo, la presencia de la secuencia del gen AOX1 en el plásmido, puede hacer que la recombinación se produzca también en la región 3' AOX1, destruyendo este gen y creándose, así transformantes Mut^s (*Methanol utilization slow*). Para conocer el fenotipo de los transformantes, se seleccionaron las colonias que habían crecido y se volvieron a crecer en placas de MM y su correspondiente réplica en MD. Las placas se incubaron a 30 °C entre 2 y 4 días (añadiendo diariamente 100 μl de metanol a la tapa de

la placa Petri, para reponer las pérdidas por evaporación) hasta que la distinción de fenotipos fuera clara.

Producción de proteínas por secreción extracelular

Para seleccionar las cepas que produjesen mayores cantidades de la proteína deseada, se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala.

Expresión en cepas Mut^s

Las células seleccionadas se inocularon en 50 ml de medio BMGY. Se incubaron a 30 °C durante 2 días, de forma que se alcanzase la saturación. Del cultivo se recogió 1 ml para congelar a -80 °C y el resto se centrifugó a 4000 xg durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de BMMY y se incubaron en erlenmeyers de 100 ml tapados con dos capas de gasa *Miracloth*, lo que permite una mayor aireación. En este medio se continuó el cultivo durante 5 días a 30 °C con agitación continua (250 rpm), de forma que cada 24 horas se le añadía metanol para una concentración final del 0.5% y se tomaba una alícuota de 1 ml. Estas alícuotas se pasaron a un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron en una microfuga a 4 °C durante 5 min, separando el medio extracelular que es el que debería contener la proteína heteróloga secretada, guardando ambas fracciones a -20 °C para su posterior análisis.

La producción a gran escala de la cepa de interés se realizó siguiendo el mismo protocolo pero partiendo de un cultivo de 1 l de BMGY e induciendo en 250 ml del medio BMMY.

Expresión en cepas Mut⁺

Se inocularon 25 ml de medio BMGY con las colonias seleccionadas y se crecieron a 30 °C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 2 y 6, momento en que las células están en fase de crecimiento logarítmico. En ese momento se toma una alícuota que se guarda a -80 °C. El resto de las células se centrifugó a 3000 xg durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 ml de medio MMH, BMMH y BMMY (se testaron los tres medios para comprobar cual conducía a una mayor expresión) durante 48 horas a 30 °C con agitación, de forma que se tomaron alícuotas de 1 ml cada 12 horas que fueron posteriormente analizadas.

La presencia de las proteínas recombinantes en el medio extracelular, se analizó mediante PAGE-SDS.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Purificación de rOle e 1 y mOle e 1

La forma recombinante y la forma mutante de Ole e 1 se han purificado siguiendo el mismo procedimiento. Después de la inducción a gran escala de la cepa escogida, el

medio extracelular se recogió por centrifugación y se dializó frente a bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0. El extracto dializado se aplicó en una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa equilibrado en bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0 y la muestra se eluyó en un gradiente de bicarbonato amónico 20 mM a 500 mM. Las fracciones que contenían la proteína recombinante se juntaron, se liofilizaron y se aplicaron en una columna de penetrabilidad de Sephadex G-75 equilibrada con bicarbonato amónico 0.2 M, pH 8.0. Las fracciones que contenían la proteína pura se juntaron y liofilizaron.

Purificación de rOle e 9

El medio extracelular resultante de la inducción a gran escala, se recogió por centrifugación y se dializó frente a bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0. El extracto dializado se aplicó en una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa equilibrada en el mismo tampón. La muestra se eluyó con un gradiente de bicarbonato amónico 50 mM a 500 mM. Las fracciones que contenían la proteína pura se juntaron.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NATURALES

Preparación de extractos de pólenes

Los extractos salinos se prepararon a partir del polen de las siguientes especies: *A. vulgaris*, *B. verrucosa*, *C. dactylon*, *F. excelsior*, *L. vulgare*, *L. perenne*, *O. europaea*, *S. vulgaris*, *Z. mays* (Allergon) y *O. europaea* (Biopol). Para ello, los granos de polen se resuspendieron en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0, al 5% (p/v), en presencia de PMSF 1 mM, se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón y la mezcla se mantuvo con agitación magnética durante 60 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el homogenizado se centrifugó a 10000 xg durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y el sedimento se resuspendió, de nuevo, en el mismo volumen de tampón salino utilizado inicialmente, repitiéndose el proceso de extracción otras dos veces. Los sobrenadantes recogidos se juntaron y liofilizaron.

Purificación de Ole e 1

El aislamiento de este alérgeno se realizó según el método descrito por Villalba y col., [1990]. Así el material liofilizado procedente de la extracción salina de 3 g de polen de olivo (Allergon AB) se aplicó en una columna de penetrabilidad en Sephadex G-75 (Pharmacia) equilibrada en bicarbonato amónico 0.2 M, pH 8.0. Las fracciones que contenían Ole e 1, se juntaron, se liofilizaron y se aplicaron en una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) empleándose como sistema de elución un gradiente lineal (0-60%) de acetonitrilo en 0.1% TFA.

Purificación de Ole e 9

El material liofilizado procedente de una extracción salina de 3 g de polen de olivo (Biopol) se resuspendió en bicarbonato amónico 0.2 M, pH 8.0 y se aplicó en una columna de penetrabilidad en Sephadex G-150 (80 x 1.5 cm) equilibrada en el mismo tampón. El flujo se fijó en 30 ml/h y se recogieron fracciones de 3 ml. El perfil de absorbancia del eluido a 280 nm se obtuvo en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7 y el contenido proteico de las fracciones se estudió mediante PAGE-SDS (12%). Las fracciones que contenían la proteína de interés, se juntaron y se liofilizaron. A continuación se realizó una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-FR). La columna empleada fue una Nucleosil C-18 (Scharlab) de 250 x 4.6 mm. El flujo se mantuvo a 1 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. Para la elución de la proteína se aplicó un gradiente lineal de acetonitrilo del 35% al 65% durante 30 min, en TFA al 0.1%. Las fracciones correspondientes al alérgeno se reunieron y se liofilizaron. Sin embargo, se observó, que tras esta etapa la proteína presentaba problemas de solubilidad por lo que se utilizaron otras etapas alternativas para conseguir su purificación.

Los lotes resultantes de dos cromatografías de penetrabilidad, se juntaron y se resuspendieron en el tampón Tris-HCl 50mM, pH 7.5/ NaCl 2M para aplicarlos en una columna de interacción hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B (Sigma) equilibrada en el mismo tampón. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó, en primer lugar, con el tapón de aplicación y, en segundo lugar, con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5/NaCl 0.5 M. A continuación se aplicó un gradiente continuo en Tris-HCl de NaCl 0.5 M a NaCl 0.0 M. La elución de Ole e 9 se realizó, en último término, con agua destilada.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

La polimerización de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad. Se realizó en un sistema discontinuo, de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli [1970]. Los geles tenían 0.75 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho. Según el caso, se emplearon sistemas de 1, 10 o 15 pocillos. Se prepararon geles homogéneos al 15% y al 12% de poliacrilamida, con un gel concentrante del 4% de acrilamida.

Las muestras de proteína se disolvieron en tampón de aplicación añadiéndose en algunos casos 2-mercaptoetanol al 5%, en cuyo caso se calentaron a 80 °C durante 20 min antes de su aplicación en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. Se aplicó una intensidad de corriente de 25 mA por gel, finalizando la electroforesis cuando el marcador azul de bromofenol comenzaba a salir del gel.

Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa o se detectaron mediante su tinción con azul de Coomassie o por detección argéntica. En el primero de los casos los geles se incubaron en una disolución de tinción que contenía azul de Coomassie R-250 al 0.3% (p/v), metanol al 45 % (v/v) y acético al 10% (v/v) [Fairbanks y col., 1971]. El exceso de colorante se eliminó por sucesivos lavados en ácido acético al 7.5%. La detección argéntica de proteínas se empleó en aquellos casos en los que debido a una baja concentración de proteína se requería una mayor sensibilidad de detección. El protocolo empleado fue el descrito por Chelliah y Jones [1990]. Tras la fijación del gel durante 1 h en metanol 50%, ácido acético 12%, 0.5 ml/l de formaldehído al 37%, se realizaron tres lavados de 20 min con etanol al 50%. El gel se trató a continuación durante 1 min con una disolución de tiosulfato sódico pentahidratado (0.2 g/l) recién preparada. Los restos se eliminaron mediante tres lavados de 30 segundos con agua destilada. A continuación, el gel se impregnó con una disolución de nitrato de plata (2 g/l) y formaldehído al 37% (0.75 ml/l) durante 20 min en constante agitación. Tras realizar dos lavados de 20 segundos en agua, se desarrolló el color mediante incubación durante más de 10 min en una disolución compuesta de carbonato sódico 60 g/l, formaldehído al 37% (0.5 ml/l), tiosulfato sódico pentahidratado (4 mg/l). Una vez eliminada la disolución de tinte mediante dos lavados de 2 min en agua destilada, la reacción de revelado se detiene por agitación del gel durante 10 min en una disolución de metanol al 50% y ácido acético al 12%. Por último, con el fin de fijar el tinte de las proteínas, el gel se incubó durante más de 20 min en metanol al 50%.

Como patrones de peso molecular en las electroforesis se emplearon las proteínas presentes en el "kit" MW-SDS-70L de Sigma.

Para la estimación del peso molecular se representaron los logaritmos decimales de los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como patrón, frente a su movilidad electroforética relativa. La interpolación en la recta patrón del valor correspondiente a la proteína problema, proporcionó el peso molecular de la misma.

Transferencia electroforética

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Towbin y col., [1979]. La transferencia se realizó en tapón Tris-base 48 mM, glicina 30 mM, SDS 0.0375%, metanol 20% a una intensidad de corriente constante de 1 mA/cm² durante 1 h. Para comprobar la eficacia de la transferencia se utilizaron patrones de peso molecular de proteínas preteñidas con azul de Coomassie (Bio-Rad). La visualización de estos patrones en la membrana no requiere de ningún tratamiento adicional a la propia transferencia.

Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo por hidrólisis de las proteínas en 0.2 ml de HCl tridestilado azeótropo 6 N conteniendo fenol al 0.1% (p/v) y norleucina (25 nmoles/ml) como estándar interno, en tubos cerrados a vacío a 110°C durante 24 horas. Finalizado el proceso, las muestras se llevaron a sequedad, sometiendo después, por dos veces, a sendos lavados con 200 µl de agua destilada, seguidos del correspondiente secado. Los hidrolizados fueron analizados en un equipo Beckman modelo System 6300 conectado a un módulo de interfase analógica System Gold. A partir de los datos del análisis se determinó la composición de aminoácidos en % molar así como la cantidad de proteína hidrolizada en cada caso.

El contenido en cisteína se determinó en forma de ácido cisteico tras la oxidación de la proteína con ácido per fórmico [Hirs, 1967] antes de llevar a cabo la hidrólisis.

Espectrometría de masas

La determinación de la masa molecular de péptidos y proteínas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Las muestras se mezclaron con una disolución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo acuoso al 30% con TFA al 0.1%. La mezcla se depositó en el pocillo de un portamuestras de acero inoxidable y se dejaron secar a temperatura ambiente. La determinación de la masa molecular se llevó a cabo empleando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Bruker REFLEX III. Los espectros fueron adquiridos como la suma de las señales iónicas generadas por un láser N₂ a 337 nm, acumulándose 60 espectros. La precisión en el cálculo de la masa molecular es mayor del 0.1%.

Detección de azúcares

Las glicoproteínas o glicopéptidos se detectaron sobre membranas de nitrocelulosa [Hsi y col., 1991] después de su transferencia electroforética a partir de geles de poliacrilamida o de su aplicación directa sobre dicha membrana. Estas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el tampón de bloqueo (TBS/polivinilpirrolidona 2%). A continuación, se incubó con la lectina Con A (10 µg/ml, Pierce) marcada con biotina, en el tampón de bloqueo durante 1 h. Después de lavar la membrana con TBS/Tritón X-100 0.1%, se incubó con el reactivo avidina, conjugada con peroxidasa (BioRad), diluido 1/1000 en TBS/polivinilpirrolidona 1% durante 30 min. La lectina unida se detectó ensayando la reacción de la peroxidasa. Para ello, se sumergió la membrana en una solución de 3'-diaminobenzidina-HCl (DAB) a 0.3 mg/ml en PBS conteniendo un 0.05% de H₂O₂. La reacción se detuvo sustituyendo la disolución de DAB por agua destilada.

Desglicosilación enzimática

Se realizó incubando la proteína disuelta a una concentración de 1.5 mg/ml en Tris-HCl 100mM, pH 8.0 que contenía PMSF 1mM y n-octilglucósido 1% (p/v), con la enzima péptido N-glicosidasa F (PNGasaF) a una relación enzima/sustrato de 6 unidades/mg de glicoproteína y la mezcla se incubó durante 18 h a 37 °C.

Digestión con tripsina y separación de péptidos

La hidrólisis con tripsina de Ole e 9 se realizó a partir de la proteína liofilizada después del HPLC. El alérgeno se resuspendió en bicarbonato amónico 0.2 M, pH 8.0 a una concentración final de 0.4 mg/ml, se sonicó durante unos segundos y se añadió tripsina tratada con TPCK (N-tosil-L-fenilalanilclorometilcetona) hasta alcanzar una relación enzima/sustrato de 1/50 (p/p). La hidrólisis se llevó a cabo a 37 °C durante 3h.

La separación de péptidos se llevó a cabo aplicando la muestra digerida en RP-HPLC. La columna empleada fue una Nucleosil C-18 (Scharlau) de 250 x 4.6 mm. Como sistema de elución se empleó un gradiente de acetonitrilo del 0 al 15% en 60 min y del 15% al 60% en 90 min. El flujo se mantuvo a 1ml/min, recogiendo los péptidos que fueran detectados, registrando su absorbancia a 280 y 214 nm.

Secuenciación automática de péptidos y proteínas

La secuencia NH₂-terminal de péptidos y proteínas purificados se determinó mediante degradación automática de Edman, en un secuenciador de fase gaseosa Applied Biosystems modelo 477A, utilizando el programa estándar, en presencia de polibreno [Tarr y col., 1978]. Los derivados feniltiohidantoínicos (PTHs) de los aminoácidos fueron identificados y cuantificados mediante un analizador de PTHs, modelo 120A, de la misma casa comercial [Hewick y col., 1981].

BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍAS Y PREDICCIONES TEÓRICAS**Masa molecular y punto isoeléctrico**

El cálculo teórico de la masa molecular y del punto isoeléctrico de Ole e 9 se realizó a partir de su estructura primaria empleando el programa MultiIdent [Wilkins y col., 1998], disponible en el servidor Expasy de Internet (<http://www.expasy.ch>).

Predicción de regiones antigénicas

La predicción de los epítomos B a lo largo de secuencia de la proteína se llevó a cabo mediante métodos que emplean parámetros de hidrofobicidad [Kyte y Doolite, 1982] y antigenicidad [Welling y col., 1985].

Búsqueda de homología de secuencia y alineamiento con proteínas homólogas

La búsqueda de similitudes de secuencia y el alineamiento de secuencias de proteínas se realizó consultando los bancos de datos SwissProt, Genbank y EMBL [Altschul y col., 1997].

Estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria de Ole e 9 se realizó a partir de la estructura primaria y mediante la aplicación de métodos estadísticos basados en la información cristalográfica existente sobre proteínas globulares [Garnier y col., 1996].

Estructura terciaria

La obtención de un modelo teórico de estructura terciaria para Ole e 9 se llevó a cabo empleando el programa Swiss-Model [Peitsch, 1995; Peitsch, 1996; Guex y Peitsch, 1997].

CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA**Espectros de absorción ultravioleta**

La obtención del espectro ultravioleta de proteínas se llevó a cabo en cubetas de 1 cm de paso óptico, empleándose un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7.

Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de CD se obtuvieron en un dicrógrafo Jasco J-715 equipado con una lámpara de Xenón de 150 W, a una velocidad de barrido de 50 nm/min. Para los espectros en el UV lejano (250-190 nm) se emplearon cubetas cilíndricas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico, y una concentración de proteína de 0.20-0.25 mg/ml en bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0, mientras que en el UV próximo (320-250nm) se emplearon cubetas de 0.4 cm y a una concentración de 1 mg/ml en el mismo tampón. La concentración exacta de proteína utilizada en cada experimento se determinó mediante análisis de aminoácidos de una alícuota del medio.

Los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo de aminoácido, en grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. El peso molecular medio por residuo de aminoácido que se consideró para este cálculo se obtuvo a partir de la composición de aminoácidos de cada proteína. La elipticidad molar por residuo se calculó a partir del registro de la elipticidad observada, según la expresión:

$$[\theta]_{\text{MWR}} = 3300 \cdot S \cdot H \cdot \text{MWR} / l \cdot c$$

siendo:

$[\theta]_{\text{MWR}}$: elipticidad molar por residuo

S: sensibilidad de detección del aparato

H: diferencia en mm entre la línea base y el espectro de la muestra

MWR: peso molecular medio de cada aminoácido

l: paso óptico en cm

c: concentración de proteína en mg/ml

Curvas de desnaturalización térmica

Con el fin de calcular la temperatura de desnaturalización de las proteínas, se realizaron las curvas de desnaturalización térmica. Para ello, el dicrógrafo se conectó a un baño Neslab RTE-111 que controló la temperatura de la cubeta. Se midieron los cambios en la elipticidad molar a 222 nm en un rango de temperaturas entre 20 °C y 80 °C, siendo el incremento de 30 °C/h.

Espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia se han obtenido en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C (SLM Instruments), equipado con un arco de Xenon de 450 W. Se emplearon cubetas de cuarzo de 0.2 cm de paso óptico de excitación y 1 cm de paso óptico de emisión. La anchura de rendija fue de 4 nm. El voltaje de los canales se ajustó de modo que la señal registrada estuviera dentro de los límites recomendados por el fabricante. En todos los casos, la señal de fluorescencia de la muestra se dividió por la señal de emisión del canal de referencia, para corregir por posibles variaciones debidas a fluctuaciones en la tensión eléctrica. Los espectros de emisión de las proteínas se registraron en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 240-350 nm, tras excitación a 275 nm. La temperatura de la muestra se mantuvo constante a 20 °C, mediante un baño de agua circulante Polystat (Haber). Las proteínas se encontraban a una concentración de 0.20-0.25 mg/ml en tampón bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0. Los espectros fueron corregidos, tras sustracción de la correspondiente línea base, por el factor de respuesta instrumental del aparato.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE Ole e 9

La actividad β -1,3-glucanasa se determinó mediante un ensayo colorimétrico, basado en la medida de los equivalentes de glucosa reducidos liberados durante la reacción enzimática [Nelson, 1944; Somogyi, 1952]. Preparación de los reactivos:

Reactivo de **Somogyi**: 24g/l de carbonato sódico anhidro, 12 g/l de tartrato sódico potásico, 4 g/l de sulfato cúprico hidratado, 16 g/l de bicarbonato sódico, 180 g/l de sulfato sódico anhidro. El reactivo preparado se mantuvo una semana en oscuridad a 37 °C hasta su

utilización.

Reactivo de **Nelson**: 25 g/l de molibdato amónico hidratado, 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, 3 g/l de arseniato bisódico. El reactivo se guarda en frasco de topacio y se mantiene a 37 °C durante 48 horas.

Para los ensayos enzimáticos, se usó la enzima diluida a distintas concentraciones en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.0, que contenía albúmina de suero bovino (BSA) 400 µg/ml. A esta solución se le añadió el sustrato, laminarina del microorganismo *Laminaria digitata* (Sigma) a una concentración final de 2 mg/ml y se incubó a 37 °C durante distintos tiempos. La reacción se paró añadiendo 100 µl del reactivo Somogyi, las muestras se incubaron a 100 °C (en baño de agua) durante 15 min, y el desarrollo del color se consiguió añadiendo 100 µl del reactivo Nelson. Por último, se añadió agua destilada hasta completar el volumen a 1ml y se realizaron las mediadas de absorción a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. En todos los ensayos se construyó una recta patrón con una solución de glucosa.

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA

Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos de fondo plano y de alta capacidad de unión. Para cada punto se utilizaron un mínimo de dos determinaciones independientes.

Se tapizan las placas con 100 µl por pocillo de una disolución del antígeno (1 µg/ml) en PBS, pH 7.2, incubándose a 4 °C durante 12-16 h, o bien durante 2 h a 37 °C. A continuación se lavan los pocillos con PBS/Tween-20 0.5% y se bloquean los sitios de unión inespecíficos con 200 µl de tampón de saturación (PBS/Tween-20 0.1%/leche en polvo 3%) durante 2 h a 37 °C. Después se incuban las placas en el tampón de saturación (100 µl/pocillo) con el anticuerpo (usado a distintas diluciones) durante 1 h o con los sueros (diluidos 1/10) durante 2h. Tras un nuevo lavado, se incubaron las placas durante 1 h con el segundo anticuerpo (100 µl/pocillo) en el tampón de saturación diluido a la mitad con PBS. Para el suero de conejo se usó como segundo anticuerpo una dilución 1/3000 de GAR-HRP, para los anticuerpos monoclonales se utilizó una dilución 1/5000 de GAM-HRP, y en el caso de suero humano (pacientes alérgicos) se empleó un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón (1/5000). En este último caso, se debe realizar una última incubación con GAM-HRP (1 h a 37 °C). Después de lavar exhaustivamente las placas, se añadió el sustrato de la peroxidasa, o-fenilendiamina (OPD, 0.63 mg/ml) en citrato sódico 0.1 M, pH 5.0, con 4% de metanol y un 0.2% de H₂O₂ (100 l/pocillo). La reacción se detuvo con 100 l de ácido sulfúrico 3 N. La lectura de densidad óptica de cada pocillo a 492 nm se realizó en un lector de ELISA Titertek Uniskan II (Flow

Labs.).

Ensayos de inhibición

Se preincubaron mezclas de anticuerpo o suero junto con distintas diluciones del antígeno que se quería usar como inhibidor. La dilución del anticuerpo utilizada correspondía a la concentración del mismo necesaria para que en su titulación mediante ELISA indirecto la densidad óptica fuese de 0.5-1.5. Estas incubaciones se mantuvieron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 h y transcurrido ese tiempo se añadieron a los distintos pocillos previamente tapizados y saturados según el procedimiento descrito en el apartado anterior. A continuación se incubó la placa durante 1 h (ó 2 h en el caso de la unión de IgE) a 37 °C y se continuó de forma idéntica a como se ha descrito para el ELISA de titulación.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición producido frente a concentración de inhibidor, estimándose de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 [1 - (\text{DO}_{\text{obs}} - \text{DO}_{\text{blanco}}) / (\text{DO}_{\text{max}} - \text{DO}_{\text{blanco}})]$$

siendo:

DO_{obs} : Densidad óptica observada a 492 nm para la correspondiente concentración de inhibidor.

$\text{DO}_{\text{blanco}}$: Densidad óptica a 492 nm en los pocillos en los que el tapizado inicial se ha hecho con PBS en lugar del alérgeno.

DO_{max} : Densidad óptica a 492 nm en aquellos pocillos en los que las coincubaciones se hacen en ausencia de inhibidor.

Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa

Después de la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó 1 h a temperatura ambiente en tampón de saturación. Seguidamente, se añadió el suero o anticuerpo diluido en el mismo tampón y se incubó 1 h (2 h en el caso de que se quiera detectar unión IgE) a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana con PBS/Tween-20 0.1%, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo correspondiente. En el caso de la detección de IgE, y al igual que en ELISA, fue necesaria una incubación adicional con GAM-HRP. Tras un nuevo lavado exhaustivo de la membrana, el revelado se llevó a cabo ensayando la actividad peroxidasa mediante el método quimioluminiscente del ECL (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los experimentos de inhibición se realizaron según el procedimiento descrito para el ELISA de inhibición, sustituyendo las placas de poliestireno por las membranas correspondientes.

Prueba cutánea (Prick-Test)

Los ensayos de prick-test se realizaron por duplicado mediante dos punciones en el reverso del antebrazo de los pacientes. Como control positivo se usó una disolución de histamina 10 mg/ml y como control negativo suero salino fisiológico. Se realizaron cuatro diluciones seriadas del alérgeno (factor de dilución 10), partiendo de una dilución inicial 1 mg/ml de rOle e 1. Tras 15 min se midieron los máximos diámetros, longitudinal (D) y transversal (d) del halo de respuesta. La superficie del mismo se calculó según la fórmula $[(D+d)/2]^2$. Las áreas de las pápulas consideradas positivas fueron $> 9\text{mm}^2$.

EXPRESIÓN DEL ALERGENO Ole e 1 EN *PICHTIA PASTORIS*

En la primera etapa, este trabajo de investigación estuvo enfocado a la puesta a punto de la tecnología requerida para el uso de un sistema de expresión heterólogo eucarionte como es la levadura *Pichia pastoris*, para producir proteínas recombinantes. Con ello se pretendía cubrir dos objetivos. El primero de ellos, producir alergenitos que ya se habían tratado de expresar con un éxito limitado en el sistema bacteriano de *E. coli*, como era el caso de Ole e 1. La expresión de la glicoproteína Ole e 1 en *E. coli*, dió lugar a la obtención de la proteína recombinante pero los niveles de producción fueron mínimos lo que restaba utilidad a la proteína. Esto podía deberse a la presencia de modificaciones postraduccionales y a una compleja trama de puentes disulfuro necesaria para su correcto plegamiento y, por tanto, para mantener sus propiedades antigénicas y alergénicas. El segundo propósito era la utilización de este sistema para producir recombinantes de alergenitos de alto peso molecular cuyo complejo plegamiento requeriría el uso de un sistema más sofisticado y menos alejado filogenéticamente de las proteínas.

Ole e 1, alergenito principal del polen de olivo, parecía, por tanto, ser el candidato más idóneo para abordar su expresión en el sistema eucarionte de la levadura *Pichia pastoris*.

Clonaje y expresión de Ole e 1

	1	10	20	30	40	50	60	70
Ole e 1	EDVPQPPVVSQFHIQGGVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLRQLQCKDKENGDTVTFTEVGYYTRAEGLYSMLVERDHK							
	I		PSR		V	R	I	K
OLE3c	-----							
OLE5c	-----		R-----		V-----	G--SI-----		I-----
OLE1c	-----	I--YV-----	TR-----	F-----	GV-----	G--KI-----		I-----
OLE33	-----							
OLE37	-----							
OLE17	-----		H-R-----		V-----	RE-----	I-----	I-----
OLE19	-----		N-----		V-----	RE-K--I-----		
OLE26	-----				V-----	E-K--I-----		
OLE6	-----		R-----		GV--E--	GGK-SI-----		I-----
OLE16	-----		R-----		GV--E-R-G-K-SI-----			I-----
OLE20	-----		R-----		GV--E-R-G-K-SI-----			I-----
	80	90	100	110	120	130	140	
Ole e 1	NEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWAKPSLKFKLNTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM							
				I	D	Y		
OLE3c	-----			V-----	I-----			
OLE5c	D-----	S---D--V--	V-----	M-----	I-----	P--F-----		
OLE1c	-----	L--S---D--	V--V--I-----		I-----	P--F-----		
OLE33	-----		V-----	I-----	L-----			
OLE37	-----		V-----	I-----	L-----			
OLE17	-----	D--I-----	I-----					
OLE19	-----	I-----	I-----		I-----	Y-----		
OLE26	-----	S-----	G-----	I-----		Y-----		
OLE6	-----	A--S---D--V--	V-----		I-----	V--P--F-----		
OLE16	-----	A--S---D--V--	V-----		I-----	V--P--F-----		
OLE20	-----	A--S---D--V--	V-----		I-----	V--P--F-----		

Figura 3: Secuencias aminoacídicas deducidas de los clones de cDNA de Ole e 1, comparadas con la de aminoácidos de Ole e 1 determinada experimentalmente mediante degradación de Edman.

De todas las isoformas que presenta Ole e 1, se escogió aquella codificada por el clon 3c (figura 3), ya que su secuencia deducida es la que mejor representa al alergeno purificado del polen [Villalba y col., 1994].

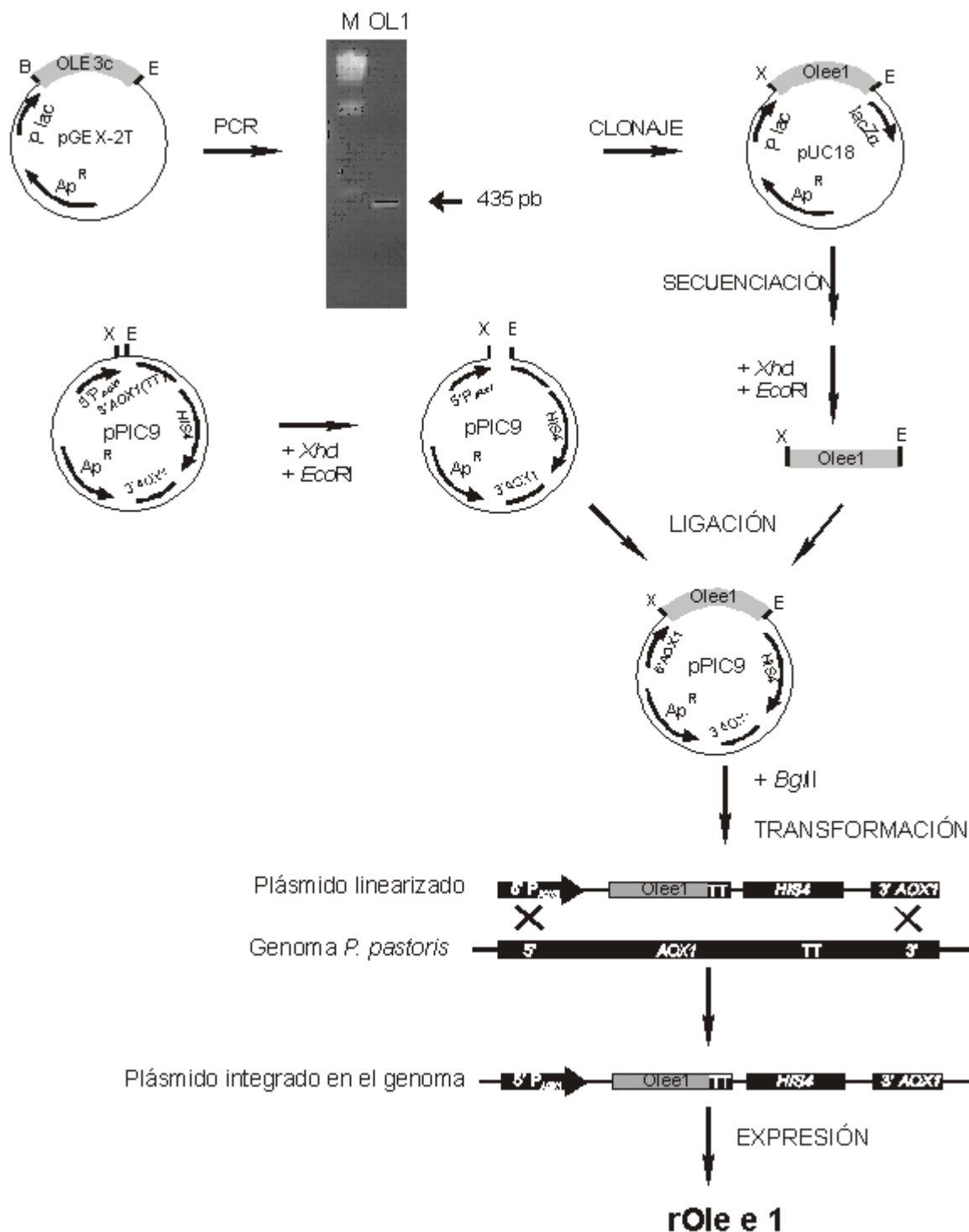


Figura 4: Estrategia del clonaje y expresión del alergeno Ole e 1. El gel muestra el fragmento de PCR; M, patrones de tamaño conocido; OL1, cDNA codificante de Ole e 1. Sitios de restricción: X, *Xho*I; E, *Eco*RI. Ap^R, gen de resistencia a ampicilina; AOX1, gen codificante de la enzima alcohol oxidasa; HIS4, gen codificante de la enzima histidinodiol deshidrogenasa.

La estrategia de clonaje de Ole e 1 se muestra en la figura 4. La región codificante fue amplificada por PCR usando como molde el plásmido pGEX-2T/Olee1 y los dos oligonucleótidos correspondientes a la secuencia NH₂-terminal y COOH-terminal de la proteína descritos en materiales y métodos: rOL1-1 y rOL1-2, respectivamente. El fragmento de DNA purificado se trató con la enzima T4 DNA polimerasa, para generar extremos romos y después con la enzima T4 polinucleótido quinasa, para fosforilar el extremo 5'. A continuación, se clonó en el sitio *Sma*I del plásmido desfosforilado pUC18. Esta construcción fue utilizada para transformar células de *E.coli* DH5 F'. Se seleccionaron algunos de los clones obtenidos, y fueron secuenciados para comprobar que no se había producido ningún cambio en la secuencia nucleotídica.

La construcción del plásmido recombinante pPIC9/Olee1 se realizó insertando el fragmento de DNA resultante de la digestión de la construcción pUC18/Olee1 con las enzimas *Xho*I y *Eco*RI en los mismos sitios del plásmido pPIC9 previamente digerido de forma que el gen de Ole e 1 queda a continuación del promotor AOX1, inducible por metanol. Para que se produzca la inserción del DNA en el genoma de la levadura es necesario que el DNA esté linearizado. Así, esta construcción se digirió con la enzima de restricción *Bgl*II. El fragmento mayor obtenido tras la digestión del plásmido, que contenía el gen de Ole e 1, se purificó y se utilizó para la transformación de células de *P. pastoris* GS115, utilizando el método del acetato de litio. De esta manera el plásmido linearizado se recombina y se inserta en el genoma de *P. pastoris*.

Las colonias transformantes seleccionadas, que mostraron un fenotipo Mut^s, es decir que el gen a expresar se había recombinado con el que codifica AOX1, se indujeron con metanol y se testó la producción de proteína a partir de ellas. Se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 h) y se analizó el nivel de expresión (figura 5A). Aunque tras 24 h de inducción ya se puede observar una banda en PAGE-SDS con una masa molecular aparente de 20.5 kDa, la máxima producción se consigue a las 96 h. Para confirmar que la proteína expresada era Ole e 1, se transfirieron las muestras a membranas de nitrocelulosa y se llevó a cabo una inmunotinción con dos anticuerpos monoclonales específicos de Ole e 1, uno de ellos, OL6 reconoce exclusivamente a la proteína nativa, dando una reacción positiva (figura 5B). Una vez escogidas las condiciones de crecimiento e inducción de las células, se seleccionó para el aislamiento de la proteína aquella colonia con la que se obtenía un mayor rendimiento (60 mg del alérgeno por litro de cultivo celular).

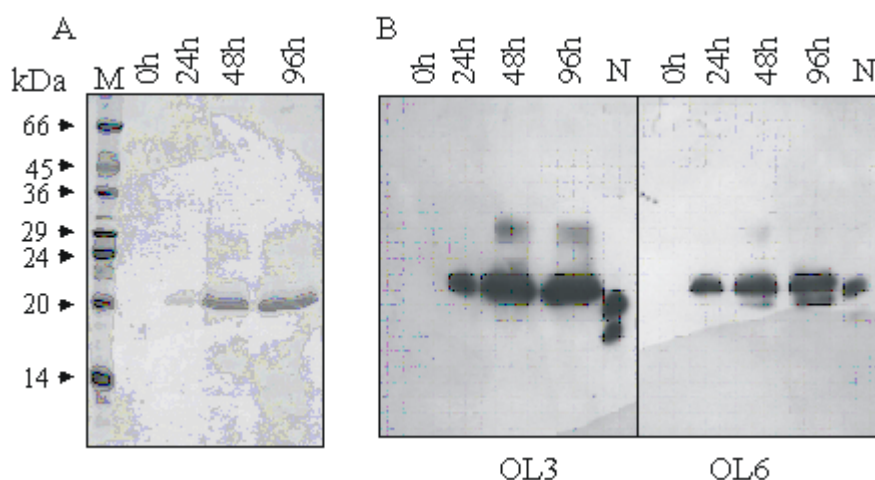


Figura 5: Expresión de rOle e 1 a distintos tiempos de inducción del cultivo, analizados mediante la tinción con azul de Coomassie (A) y por inmunotransferencia con dos monoclonales (OL3 y OL6) obtenidos frente a nOle e 1 (B). N, nOle e 1; M, patrones de masa molecular conocida.

Aislamiento del alérgeno recombinante rOle e 1

Como se ha mencionado en el apartado de materiales y métodos, este sistema de expresión permite la obtención de la proteína como producto de secreción. Este hecho facilitó notablemente su purificación, ya que *P. pastoris* secreta un número pequeño de sus proteínas naturales y en baja concentración. Dicho aislamiento se llevó a cabo mediante dos etapas cromatográficas, posteriores a la diálisis del medio extracelular para eliminar los contaminantes de masa molecular pequeña presentes, entre los que cabe destacar pigmentos, lípidos y carbohidratos que contiene el medio de inducción celular. La muestra se aplicó primeramente en una columna de intercambio iónico en DEAE-celulosa y la proteína se eluyó con un gradiente en bicarbonato amónico pH 8.0. El perfil de elución se registró mediante absorción ultravioleta a 280 nm y las fracciones se analizaron mediante electroforesis en PAGE-SDS (15%) (figura 6A). El alérgeno recombinante eluye en el gradiente a una fuerza iónica de 0.18 M. Las fracciones que contenían el alérgeno recombinante presentaban como principal contaminante una proteína de alto peso molecular procedente de la secreción de las células de *P. pastoris*, por lo que en segundo lugar se aplicó una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-75, cuyo perfil de elución se representa en el panel B de dicha figura.

El análisis electroforético de las distintas fracciones obtenidas después de cada etapa de purificación de rOle e 1 se muestra en la figura 6C. El rendimiento de la producción es de 25 mg del alérgeno recombinante puro por litro de cultivo celular.

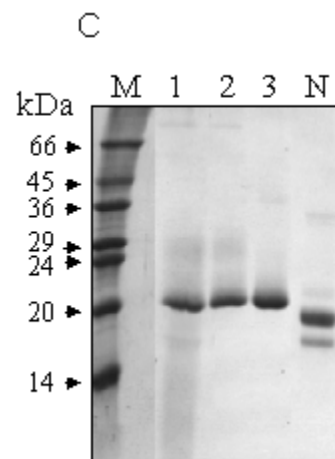
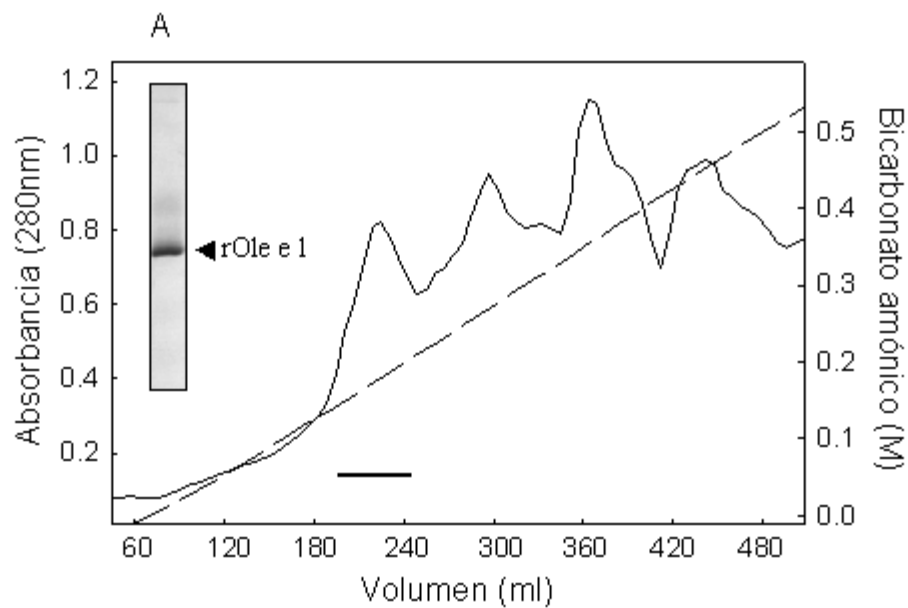


Figura 6: Análisis de las etapas de purificación del alérgeno recombinante rOle e 1. (A) Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Se incluye el análisis mediante PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie del lote que contienen dichas fracciones. (B) Perfil de elución de la cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-75. La absorción de las fracciones del eluido se registró a 280nm. Las fracciones correspondientes a rOle e 1 se marcan con una línea gruesa. (C) Análisis en PAGE-SDS de la purificación de rOle e 1, después de la diálisis, carril 1; después de la cromatografía en DEAE-celulosa, carril 2; y rOle e 1 purificada después del Sephadex G-75, carril 3. N, nOle e 1; M, marcadores de masa molecular.

La homogeneidad de rOle e 1 después de esta segunda etapa de purificación quedó demostrada con el pico único y simétrico que se obtuvo en la cromatografía en RP-HPLC en fase reversa utilizando un gradiente de acetonitrilo del 0 al 60% en 0.1% TFA (figura 7). En las mismas condiciones se aplicó una muestra de nOle e 1. En el perfil de elución, se

puede observar la homogeneidad de rOle e 1 (clon 3c) comparada con el polimorfismo que presenta nOle e 1. Dicho polimorfismo explica la existencia de un número de isoformas con distintas composiciones aminoacídicas lo cual repercute en los tiempos de elución de cada una de ellas, de forma que en un gradiente de acetonitrilo suficientemente extendido, se observa la aparición de varios picos.

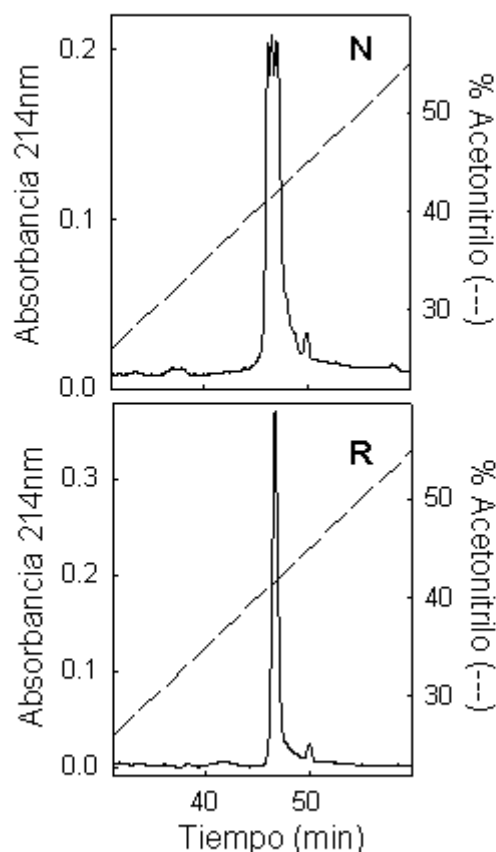


Figura 7: Perfil de elución de nOle e 1 (N) y rOle e 1 (R) en RP-HPLC (columna Nucleosil C₁₈).

Caracterización molecular de rOle e 1

El alérgeno recombinante, rOle e 1, presenta una masa molecular aparente de 20.5 kDa, valor ligeramente superior que el de la forma glicosilada del alérgeno natural nOle e 1 (20.0 kDa) y significativamente mayor que el de la forma no glicosilada (18.5 kDa). Para explicar estas diferencias, se analizó la presencia de azúcares en rOle e 1 mediante la reacción de la proteína, transferida a membrana de nitrocelulosa, con la lectina ConA, que se une específicamente a restos de manosa. Como se muestra en la figura 8A y comparada con la tinción de nOle e 1, la reacción de rOle e 1 fue positiva. La reacción con Con A de nOle e 1 muestra dos bandas que difieren en su grado de glicosilación, una se corresponde a la forma glicosilada de 20.5 kDa y la otra con la forma de 22 kDa que consiste en una estructura con un mayor contenido en carbohidratos. Para confirmar que la diferencia de masa molecular entre rOle e 1 y nOle e 1 era exclusivamente debido al azúcar, se llevó a

cabo la desglicosilación de ambas proteínas con la enzima endoglicosidasa, PNGasa F. El análisis mediante PAGE-SDS de las proteínas desglicosiladas muestra que ambas presentan la misma movilidad electroforética mostrando una masa molecular aparente de 18.5 kDa (figura 8B). Como se observa en el carril 2 de la figura 8B, el tratamiento de la proteína natural conduce a una inversión del patrón electroforético con respecto al de la proteína nativa, no produciéndose la desglicosilación total de la misma. Este hecho es debido a que la enzima PNGasa F hidroliza los enlaces 1 N entre la GlcNAc interna y la Asn de la cadena polipeptídica, con la excepción de aquellas estructuras glicosídicas que contienen un residuo de fucosa 1 3 unido a la GlcNAc interna [Tretter y col., 1991], como es el caso de Ole e 1.

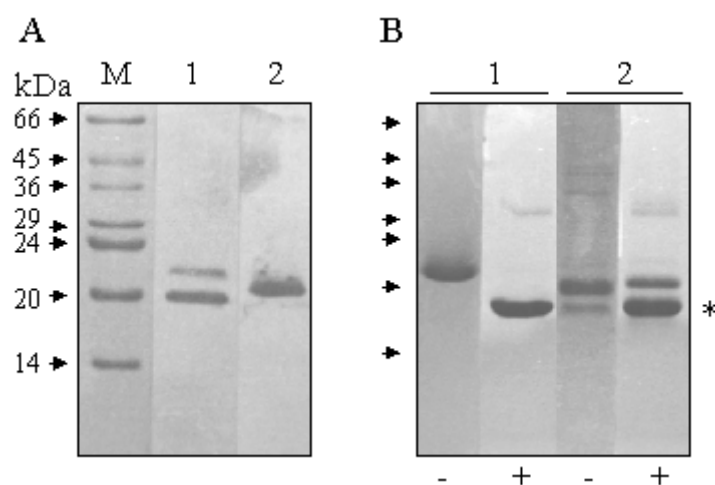


Figura 8: (A) Reacción con Con A de nOle e 1 (1) y rOle e 1 (2). (B) PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie de los alérgenos rOle e 1 (1) y nOle e 1 (2), tratados (+) y sin tratar (-) con la enzima PNGasa F. M, marcadores de peso molecular; * movilidad electroforética de la forma desglicosilada de Ole e 1.

Para confirmar estos resultados, se llevó a cabo el análisis mediante espectrometría de masas de rOle e 1 sin tratar y tratada con PNGasa F. Como muestra la figura 9, la forma desglicosilada muestra un solo pico homogéneo de 16 372 Da mientras que la forma sin desglicosilar muestra cuatro picos diferentes entre 18 226 y 18 702 Da. La diferencia de masa molecular entre cada especie y la siguiente es de 160 Da, lo cual se corresponde con la masa molecular de un residuo de manosa. Este resultado demostraría la existencia de varias formas de rOle e 1 con diferentes grados de glicosilación: 18 226, 18 381, 18 534 y 18 702 Da que se corresponderían con la masa de la cadena polipeptídica más $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_{10}\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_{11}\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_{12}\text{GlcNAc}_2$, respectivamente. Es un hecho constatado y descrito en la literatura que las proteínas secretadas por *P. pastoris* presentan oligosacáridos unidos a Asn que presentan un patrón $\text{Man}_{8-13}\text{GlcNAc}_2$ [Trimble y col., 1991; Miele y col., 1997]. Dicho patrón de glicosilación, rico en manosas y bastante conservado, se confirma en el alérgeno recombinante Ole e 1. En cualquier caso, la longitud

de las cadenas del grupo glicosídico que *P. pastoris* une a las proteínas (8-10 azúcares) es mucho menor que el que tiene lugar en *S. cerevisiae* (>50 unidades de azúcar) [Grinna y col., 1989; Tschopp y col., 1987]. Además el polisacárido no tiene las uniones terminales del tipo 1,3 que produce *S. cerevisiae* y que pueden ser antigénicas [Cregg y col., 1993; Romanos y col., 1992]. Esto hace de *P. pastoris* un sistema mucho más adecuado que *S. cerevisiae* para expresar proteínas que contengan sitios de glicosilación.

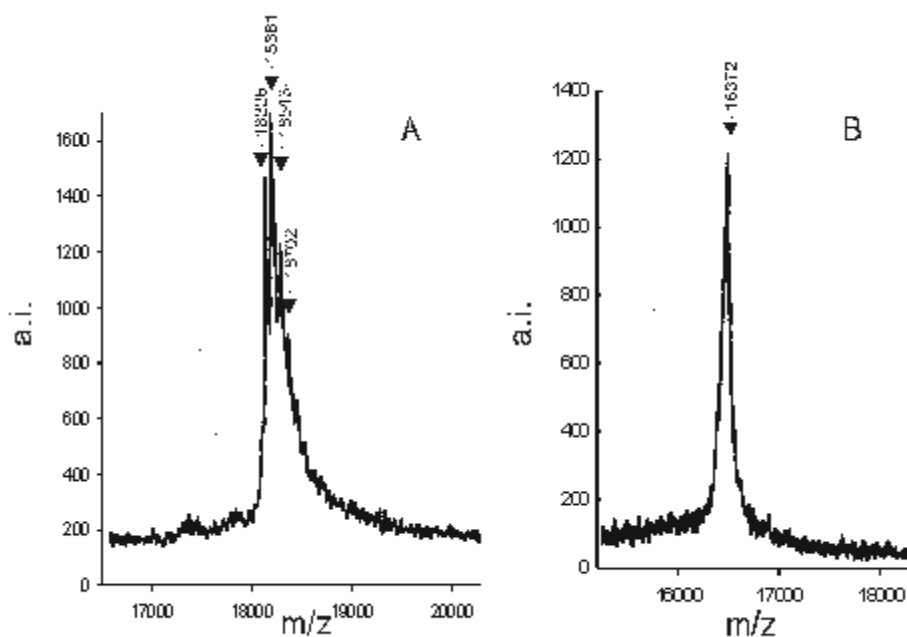


Figura 9: Espectrometría de masas de rOle e 1 antes (A) y después (B) de su tratamiento con PNGasa F.

Se han utilizado otros métodos analíticos para evaluar la pureza de rOle e 1, así como su similitud con nOle e 1. Se han comparado las composiciones de aminoácidos de los dos alergenitos obtenidos por hidrólisis ácida y análisis automático (tabla 8). La composición experimental de rOle e 1 se ajusta perfectamente a la deducida del clon 3c, lo que es otro dato a favor de la pureza de la muestra. Las pequeñas diferencias encontradas entre el alergenito natural y el recombinante deben atribuirse al polimorfismo de la proteína natural.

Por otro lado, se secuenciaron por degradación de Edman, cuatro péptidos resultantes de la digestión triptica de rOle e 1, así como su extremo N-terminal. Las secuencias de aminoácidos obtenidas se corresponden con las esperadas para las posiciones 1-7, 41-52, 61-71, 116-124, y 126-130: EDVPQPP, LQCKDKENG DVT, AEGLYSMLVER, TVNPLGFFK, y EALPK, respectivamente. Otro dato más a favor tanto de la pureza como de la calidad del alergenito recombinante producido en *P. pastoris*.

Tabla 8: Composición de aminoácidos de rOle e 1 y nOle e 1 purificadas, así como del clon secuenciado.

Aminoácido	nOle e 1 ^a	rOle e 1 ^b	clon 3c ^c
Cys	6	6	6
Asx	14	14	14
Thr	11	11	11
Ser	7	7	7
Glx	18	18	18
Pro	10	10	10
Gly	11	12	11
Ala	6	6	5
Val	8	10	10
Met	3	3	3
Ile	7	7	7
Leu	11	11	11
Tyr	5	4	5
Phe	8	7	8
His	2	3	2
Lys	11	9	10
Arg	6	6	6
Trp	1	1	1
Total	145	145	145

^a Villalba y col. [1993]

^b Calculado basándose en la masa molecular

^c Deducido de la secuencia de nucleótidos

Caracterización espectroscópica de rOle e1

Uno de los mayores inconvenientes en la obtención de moléculas recombinantes es que no siempre se obtiene una molécula con una estructura tridimensional equivalente a la de la proteína obtenida de la fuente natural. Este hecho repercute de manera decisiva en las características funcionales de los alérgenos, que necesitan un correcto plegamiento para conservar las propiedades alérgicas y antigénicas.

Para estudiar el plegamiento de rOle e 1, se han obtenido sus espectros de dicroísmo circular en el UV lejano (190-250 nm) y en el próximo (250-340 nm) y se han comparado con los del alérgeno natural. Como se observa en la figura 10A y B, no hay diferencias entre ellos, no sólo en la forma del espectro sino también en los valores de elipticidad molar. Como ya se ha descrito para nOle e 1 [Villalba y col., 1993], a partir del espectro en el UV-lejano se puede deducir la estructura secundaria del alérgeno: 21% hélice, 21% lámina, 27 % giros y 31% de conformación aperiódica. El espectro en el UV-próximo sólo

presenta una banda negativa centrada a los 287 nm, correspondiente al único residuo de triptófano de la molécula. También se han analizado los espectros de fluorescencia de rOle e 1 y nOle e 1 (figura 10C). Ambos tienen curvas solapantes lo que confirma que no se ha producido ningún cambio en el entorno del Trp ni en el de ninguna de las 5 Tyr que posee Ole e 1. Todos estos resultados indican que el alérgeno recombinante presenta un plegamiento correcto tanto a nivel de estructura secundaria como a nivel de estructura terciaria.

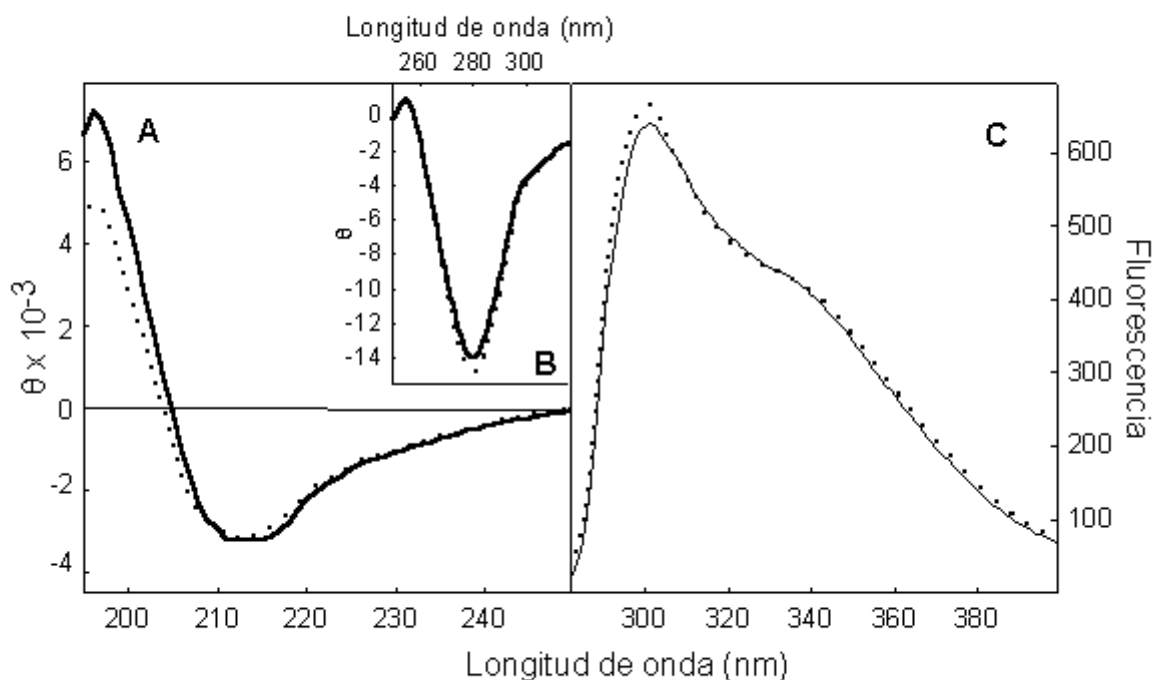


Figura 10: Análisis espectroscópico de nOle e 9 (—) y rOle e 9 (·····). Espectros de CD en el UV lejano (A) y en el próximo (B). Los valores se expresan como elipticidad molar por residuo, en grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. (C) Espectros de emisión de fluorescencia obtenidos tras excitar la muestra a 275 nm.

Caracterización inmunológica de rOle e 1

La capacidad de unir IgG e IgE de forma equivalente al alérgeno natural es un punto clave en la caracterización de rOle e 1. Por tanto, se ha ensayado, mediante inmunotransferencia, el reconocimiento de cuatro anticuerpos monoclonales obtenidos frente a nOle e 1 (figura 11A). Para ello se ha empleado el alérgeno recombinante y el natural, este último reducido y sin reducir con β -mercaptoetanol y tratamiento térmico a 100°C. Se observa que todos ellos se unen de igual forma a los dos alérgenos en condiciones no reductoras. Sin embargo, los tres últimos no reconocen nOle e 1 desnaturalizada. Estos resultados nos indican que rOle e 1 mantiene los determinantes antigénicos y, por tanto, la conformación nativa necesaria para unirse a estos anticuerpos. Los mismos resultados se han obtenido cuando se ha ensayado la capacidad de unión a un

anticuerpo policlonal obtenido frente a nOle e 1 (figura 11B) que muestra la misma reactividad frente a nOle e 1 que frente a rOle e 1, así como frente a una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo (figura 11C) lo que demuestra que ambas proteínas mantienen la misma capacidad para unir IgE.

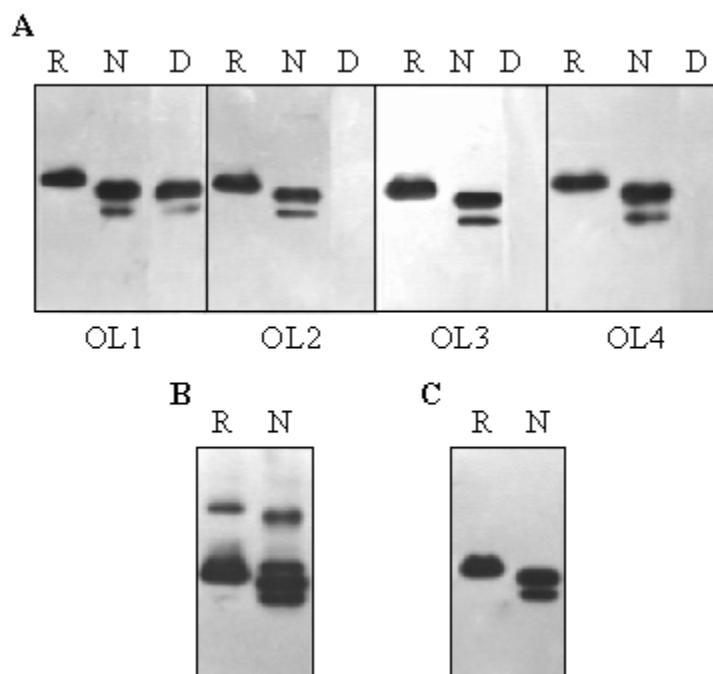


Figura 11: Inmunodetección de rOle e 1 (R), nOle 1 (N) y nOle e 1 desnaturalizada por tratamiento térmico a 90° en presencia de -ME (D), con cuatro anticuerpos monoclonales, OL1, OL2, OL3 y OL4 (A); con un anticuerpo policlonal (B) y con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo (C).

La unión de IgE a rOle e 1 y a nOle e 1 se midió de forma cuantitativa mediante un ensayo de titulación (figura 12) así como mediante ensayos de inhibición en ELISA (figura 13) usando la mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos a olivo usada anteriormente para ensayos de inmunotransferencia.

En los ensayos de inhibición se tapizó con una u otra proteína y se inhibió alternativamente con las dos. Ambos alérgenos presentan, prácticamente, la misma capacidad para inhibir la unión de anticuerpos IgE al otro, indicando que son inmunológicamente equivalentes, y que ambas formas son capaces de saturar los epítopos IgE de la otra. Las mínimas diferencias observadas podrían atribuirse al polimorfismo (alguna de las posiciones heterogéneas podrían estar implicadas en el reconocimiento específico por parte de IgE de pacientes) que presenta la proteína natural frente a la especie única que constituye la forma expresada. Por otro lado, se ha demostrado que el oligosacárido de Ole e 1 presenta actividad antigénica y alérgica, siendo capaz de provocar la liberación de histamina en los pacientes alérgicos [Batanero y col., 1994a;

Batanero y col., 1999], aunque rOle e 1 contiene un componente glicosídico, éste no tiene la misma estructura que la del azúcar presente en la forma natural, lo que presumiblemente disminuiría el reconocimiento de aquellos pacientes que posean IgE frente al azúcar.

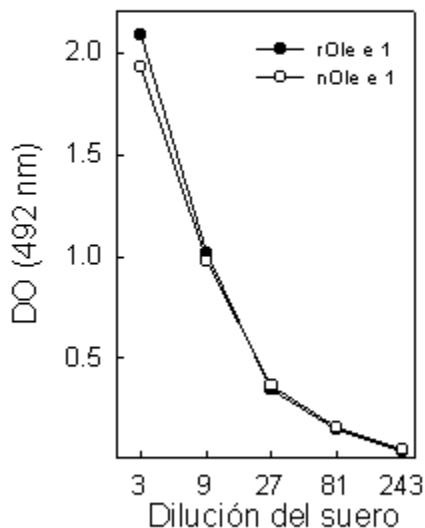


Figura 12: Curvas de unión de IgE de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a nOle e 1 y rOle e 1.

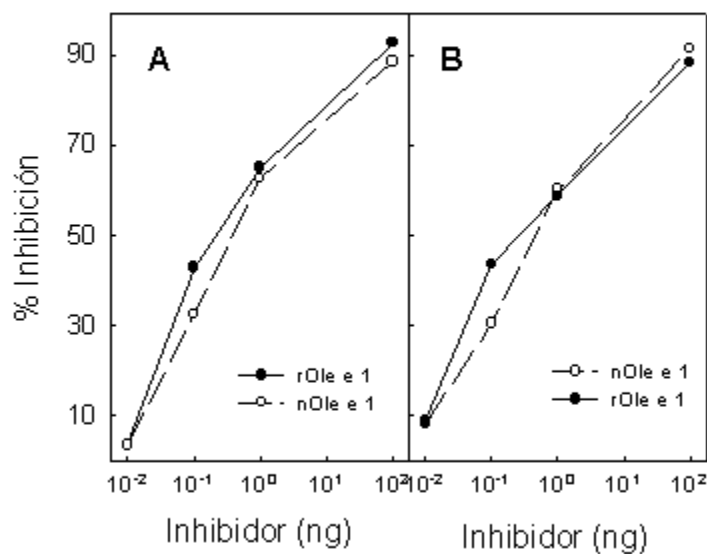


Figura 13: Curvas de inhibición en ELISA de la unión de IgE a rOle e 1 (A) y a nOle e 1 (B) adsorbidos a poliestireno utilizando como inhibidores nOle e 1 y rOle e 1.

Pruebas cutáneas (prick-test)

Una vez comprobado que rOle e 1 tiene la misma capacidad para unir IgE e IgG *in vitro* que nOle e 1, quedaba por evaluar la actividad inmunológica de rOle e 1 en una población de pacientes alérgicos al olivo usando diagnóstico cutáneo (prick-test).

Tabla 9: Valores de unión de IgE específica a nOle e 1 y a rOle e 1 obtenidos mediante ELISA y prueba cutánea.

Paciente	rOle e 1 prueba cutánea*				ELISA**	
	0.1 g/ml	1 g/ml	10 g/ml	100 g/ml	nOle e 1	rOle e 1
1			90	211	1.35	1.17
2			64	82	2.5	2.5
3			77	157	1.91	1.77
4	17	10	77	241	0.39	0.34
5			69	222	1.27	1.25
6			77	156	2.5	2.5
7	15	15	57	196	1.02	0.72
8			46	272	0.10	0.12
9	9	28	36	134	0.76	0.66
10			52	81	0.49	0.45
11			64	170	0.36	0.31
12			36	155	1.23	1.22
13			69	197	0.18	0.16
14			109	100	0.23	0.25
15			100	649	0.05	0.04
16		18	24	197	2.07	1.97
17		12	106	207	0.36	0.29
18		14	23	204	0.58	0.46
19			61	164	0.17	0.14
20			158	385	0.73	0.60
21			50	90	0.44	0.38
22			53	104	0.23	0.20
23			52	105	2.43	2.18
24			39	165	0.29	0.24
25			61	122	0.53	0.46
26			138	253	0.16	0.15
27			58	127	0.28	0.25
28			129	676	0.26	0.22
29			68	212	0.11	0.09
30			45	121	0.14	0.14
31			77	68	0.64	0.56
32			49	116	1.73	1.54
33			42	336	2.5	2.5

* media del área de la pápula en mm²

** unidades de DO (492nm)

Para llevar a cabo este experimento se han utilizado sueros de 33 pacientes que padecían rinitis y/o asma y que en pruebas cutáneas daban positivo al extracto total de olivo y a nOle e 1. Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla 8 donde se puede observar que todos los pacientes reaccionan frente a rOle e 1, aunque a distintas diluciones. Entre ellos, 3 pacientes (9%) reaccionan a 0.1 g/ml, 6 pacientes (18%) reaccionaron a 1 g/ml (9%) y los 24 pacientes restantes (73%) mostraron una respuesta positiva a 10 y 100 g/ml. Estos resultados demuestran que la precisión en el diagnóstico de pacientes alérgicos a Ole e 1 es del 100% cuando se utiliza el alergen recombinante.

Mediante un ensayo en ELISA se ha analizado la unión de IgE a nOle e 1 y a rOle e 1 del suero de los mismos pacientes usados en la prueba cutánea (tabla 9). Aunque con la mayoría de los sueros, los valores de densidad óptica obtenidos para rOle e 1 era ligeramente inferior que los obtenidos para nOle e 1, como se observa en la figura 14, existe una correlación lineal entre los valores obtenidos para ambas formas del alergen. Las diferencias observadas podrían deberse al polimorfismo de la forma natural y/o la ausencia en rOle e 1 del epítipo presente en el componente glicosídico de nOle e 1.

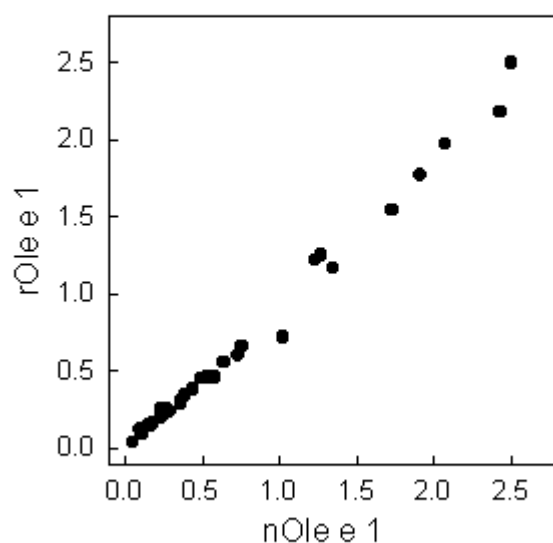


Figura 14: Análisis de los valores de DO obtenidos mediante ensayo de ELISA de la unión de IgE de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo a nOle e 1 y a rOle e 1.

Los resultados que se han obtenido en estos ensayos clínicos demuestran que la forma recombinante de Ole e 1 expresada en *P. pastoris* tiene una actividad alérgica comparable a la de la forma natural, siendo su uso igualmente eficaz y seguro en la población estudiada, quedando así, demostrada su eficiencia en el diagnóstico de los pacientes alérgicos.

Durante los últimos años, se han realizado numerosos estudios que sugieren que todos aquellos alergenicos recombinantes obtenidos utilizando sistemas de expresión adecuados a sus características moleculares pueden ser empleados en el diagnóstico de las personas alérgicas al polen, ácaros e himenópteros [Valenta y col., 1998a; Scheiner y col., 1995]. Sin embargo, tan sólo algunos alergenicos han sido validados mediante prueba cutánea en una población de pacientes alérgicos, como por ejemplo, los alergenicos rBet v 1 y rBet v 2, del polen de abedul [Pauli y col., 1996], rDer p 2 del ácaro del polvo *D. pteronyssinus* [Lynch y col., 1994], rApi m 1 del veneno de abeja [Muller y col., 1995] y los alergenicos de *Aspergillus fumigatus*: rAsp f 1 [Moser y col., 1994] y rAsp f 3 [Hemmann y col., 1998].

La precisión del test empleando alergenicos recombinantes mejorará notablemente tanto el diagnóstico, CRD (Component Resolved Diagnostic), como la inmunoterapia CRIT (Component Resolved Immunotherapy) [Valenta y col., 1999] de las enfermedades alérgicas. Durante los últimos años, numerosos estudios han demostrado las ventajas del uso de alergenicos recombinantes en el diagnóstico ya que permite determinar de forma individualizada los alergenicos hacia los que cada paciente presenta IgE, así como cuantificar los niveles de anticuerpos que presenta. En un futuro no muy lejano, la finalidad última, gracias a la disponibilidad de alergenicos recombinantes, será el diseño de una inmunoterapia específica, lo que implica el uso de una combinación hecha con número adecuado de alergenicos frente a los cuales cada paciente presente IgE, o bien el diseño de vacunas universales que cubran todos los epítomos presentes en cada extracto alérgico.

Determinación preliminar de la estructura de Ole e 1 por cristalización y difracción de rayos X

Para la determinación de la estructura tridimensional de una proteína tanto por difracción por rayos X como por resonancia magnético nuclear, es necesaria la utilización de una alta cantidad de una única forma molecular de la proteína (varios mg). En numerosas ocasiones, esto no es posible para los alergenicos obtenidos de su fuente natural, ya que tan solo se pueden obtener en cantidades limitadas, unido a que muchos de ellos son polimórficos. Gracias a la obtención de los alergenicos como formas recombinantes producidas en grandes cantidades y con propiedades estructurales equivalentes a las de los alergenicos naturales, será posible la determinación de la estructura tridimensional de muchos de ellos.

La producción de Ole e 1 en *P. pastoris* ha permitido la obtención de altos niveles del alergeno principal del polen de olivo que conserva intactas sus propiedades antigénicas. Además se trata de una molécula homogénea y perfectamente definida a nivel molecular, algo imposible de obtener a partir de su fuente natural ya que el aislamiento de Ole e 1 conlleva la obtención de un elevado número de variantes y la purificación de cada isoforma

es, en la práctica, imposible.

Se han obtenido cristales de rOle e 1 (figura 15), lo cual apoya el perfecto plegamiento del alérgeno recombinante. Sin embargo, los cristales obtenidos, por el momento, no han sido capaces de difractar, lo que posiblemente pueda atribuirse a la presencia del azúcar.

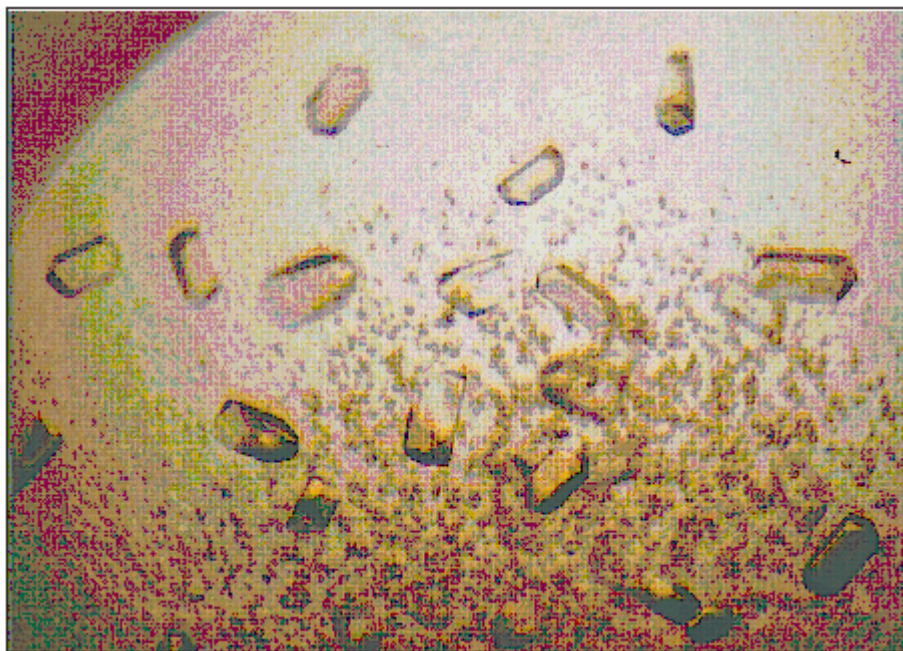


Figura 15: Fotografía tomada a los cristales obtenidos por los Dtores Martín Martínez-Ripoll y Armando Albert [Martínez-Ripoll y col., 1998].

A la vista de todos los resultados presentados, se puede concluir que el alérgeno recombinante obtenido con un alto rendimiento (25mg/l de cultivo) en *P. pastoris* exhibe los epítopos alérgénicos y antígenos de la forma natural gracias, por otra parte, a su correcto plegamiento, demostrado mediante su estudio espectroscópico. Por tanto, este alérgeno recombinante conserva las propiedades inmunológicas de la proteína natural por lo que podría ser empleado en clínica con fines de diagnóstico y terapia.

Ole e 1 había sido expresado previamente en *E. coli* empleando el plásmido pGEX-2T obteniéndose como proteína de fusión unida a la enzima glutatión S-transferasa [Villalba y col., 1994]. Aunque el alérgeno recombinante mantenía las propiedades inmunológicas de la forma natural, el rendimiento de la producción fue bajo obteniéndose tan sólo 200 µg de la proteína por litro de cultivo celular. Estos niveles tan bajos en la producción de Ole e 1 se pueden explicar si tenemos en cuenta que las bacterias, a diferencia de las levaduras, no poseen un citoplasma oxidante y carecen de las enzimas (disulfuro isomerasas) encargadas de formar los puentes disulfuro correctos. Por esta razón, las proteínas expresadas en *E. coli* son producidas en cuerpos de inclusión y tienen que ser

replegadas a partir de su forma insoluble, lo que le convierte en un sistema inadecuado para la producción de proteínas que, como Ole e 1, tengan puentes disulfuro y la formación de éstos sea necesaria para su correcto plegamiento. El resultado, y uno de los mayores límites de este sistema, es el bajo rendimiento en la obtención de las proteínas recombinantes sobre todo cuando éstas tienen un complejo plegamiento y experimentan modificaciones postraduccionales [Yasukawa y col., 1995]. Por el contrario, *P. pastoris* permite una elevada producción de las proteínas recombinantes biológicamente activas, ya que son producidas con los puentes disulfuro correctos [White y col., 1994]. Además, son secretadas al medio extracelular facilitando notablemente su purificación.

En bacterias han sido expresados con éxito aquellos alérgenos que no tienen ninguna cisteína formando puentes disulfuro, que no presentan modificaciones postraduccionales como la glicosilación y que, además, son de bajo peso molecular. Entre éstos se encuentra el alérgeno del polen de olivo Ole e 3 que ha sido producido en *E. coli* de forma soluble y con un alto rendimiento [Ledesma y col., 1998b], así como sus homólogos en otros pólenes: Cyn d 7, de la gramínea *C. dactylon* [Suphioglu y col., 1997], Bet v 4 del polen de abedul [Engel y col., 1997], Aln g 4 de polen de aliso [Hayek y col., 1998] y Phl p 7 de la gramínea *P. pratense* [Niederberger y col., 1999].

Otros sistemas de expresión derivados de formas eucariotas superiores, tales como las células de insectos (baculovirus) han sido empleados para la obtención de alérgenos recombinantes y éstos mantienen las características moleculares e inmunológicas de la forma natural, como es el caso de Lep d 2, alérgeno del ácaro *Lepidoglyphus destructor* [Olsson y col., 1998], Sol i 2, del veneno de hormiga [Schmidt y col., 1996] y un alérgeno de la orina del ratón [Stacks y col., 1996]. Sin embargo, *P. pastoris* presenta ventajas sobre este sistemas de expresión ya que es un organismo unicelular lo que facilita su manipulación resultando más rápido, fácil y económico.

Por todas estas razones, *P. pastoris* se ha convertido, en los últimos años, en un sistema de producción muy utilizado para expresar alérgenos y proteínas en general. En la tabla 10 se representan los alérgenos de distintas fuentes biológicas (hongos, insectos, animales y plantas) expresados en este sistema. Algunos de ellos, como por ejemplo Cyn d 1, alérgeno principal de *C. dactylon*, que es una glicoproteína de 26.8 kDa y presenta polimorfismo, ha sido expresado en *E. coli* y *P. pastoris*, y se han comparado las características moleculares e inmunológicas en ambos sistemas de producción [Smith y col., 1996]. En este caso en particular el resultado es que sólo la proteína expresada en *P. pastoris* era capaz de unir IgE de pacientes alérgicos, sugiriendo que las modificaciones postraduccionales que ocurren en las células eucariotas son necesarias para la producción del alérgeno inmunológicamente activo.

Tabla 10: Alergenos producidos en *P. pastoris*.

Alergeno	Organismo	Rendimiento (mg/L)	Referencia
Hongos			
Alt a 1	<i>Alternaria alternata</i>	ND	De Vouge y col., 1996
Alt a 2	<i>Alternaria alternata</i>	180	Bush y col., 1999
Asp f 2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ND	Tang y col., 2000
Der f 1	<i>Dematophagoides farinae</i>	ND	Best y col., 2000
Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	ND	Best y col., 2000
-sarcina	<i>Aspergillus giganteus</i>		Martínez-Ruiz y col., 1997
Insectos			
Ag 5	<i>Vespula vulgaris</i>	100	Monsalve y col., 2000
Ag 5	<i>Polistes annularis</i>	105	Monsalve y col., 2000
Bla g 4	<i>Blatella germanica</i>	50	Vailes y col., 1998
Per a 1	<i>Periplaneta americana</i>	14	Melen y col., 1999
Animales			
Bos d 2	<i>Bos spp</i>	ND	Rautiainen y col., 1998
CA	<i>Felix domesticus</i>	3.3	van Ree y col., 1999b
Cte f 1	<i>Ctenocephalides felis</i>	ND	McDermott y col., 2000
Mus m 1	<i>Mus musculus</i>	270	Ferrari y col., 1997
Plantas			
Hev b 7	<i>Hevea brasiliensis</i>	10	Sowka y col., 1998b Breiteneder y col., 1999
LTP	<i>Daucus carota</i>	ND	Asero y col., 2000
LTP	<i>Triticum sativum</i>	720	Klein y col., 1998
Per s 1	<i>Persea americana</i>	50	Sowka y col., 1998a
Pólenes			
Amb a 6	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ND	Hiller y col., 1998
Cyn d 1	<i>Cynodon dactylon</i>	1500	Smith y col., 1996
Phl p 1	<i>Phleum pratense</i>	ND	Petersen y col., 1997

ND, no determinado. Todos los alergenitos presentados se obtuvieron como proteínas de secreción.

EXPRESIÓN EN *PICHTIA PASTORIS* DE UN MUTANTE NO GLICOSILADO DE Ole e 1

Como ya se ha mencionado, la expresión de Ole e 1 en *P. pastoris* había proporcionado una molécula homogénea, bien definida, correctamente plegada y de alta calidad inmunológica. Sin embargo, una de las posibles aplicaciones y usos de la proteína, como es la obtención de su estructura tridimensional, no ha proporcionado resultados suficientemente satisfactorios. Ésta fue infructuosa debido, probablemente, a la presencia del azúcar polimórfico unido a la molécula. Así se planteó la producción de una proteína mutante no glicosilada de Ole e 1 en el mismo sistema. Puesto que Ole e 1 presenta un único sitio de glicosilación en la Asn-111 (N/G/T), la estrategia seguida fue llevar a cabo la sustitución de este residuo por una Gln, así la proteína expresada en *P. pastoris*, no presentaría el grupo glicosídico.

Amplificación, clonaje y expresión de mOle e 1

Para obtener la región codificante completa del mutante mOle e 1 introduciendo en ella la alteración en la secuencia consenso de glicosilación mediante la sustitución del triplete AAT, que codifica la Asn, por el triplete CAA que codifica la Gln, se llevó a cabo una serie de tres etapas de amplificación mediante PCR. En las dos primeras se usó como molde la construcción pPIC9/Olee1 y en la tercera se usó como molde los propios fragmentos solapantes de DNA 1 y 2, obtenidos en las anteriores etapas (figura 16). Los cuatro oligonucleótidos empleados están descritos en materiales y métodos. El fragmento de DNA obtenido en esta última amplificación se purificó y se clonó en el vector pCR2.1. Después de transformar con esta construcción células de *E. coli* INV⁻ F⁻, se procedió a la secuenciación de varios de los clones obtenidos para comprobar que el único cambio que se había producido en la secuencia de nucleótidos que codifica Ole e 1 era el de la Asn de la posición 111 por una Gln.

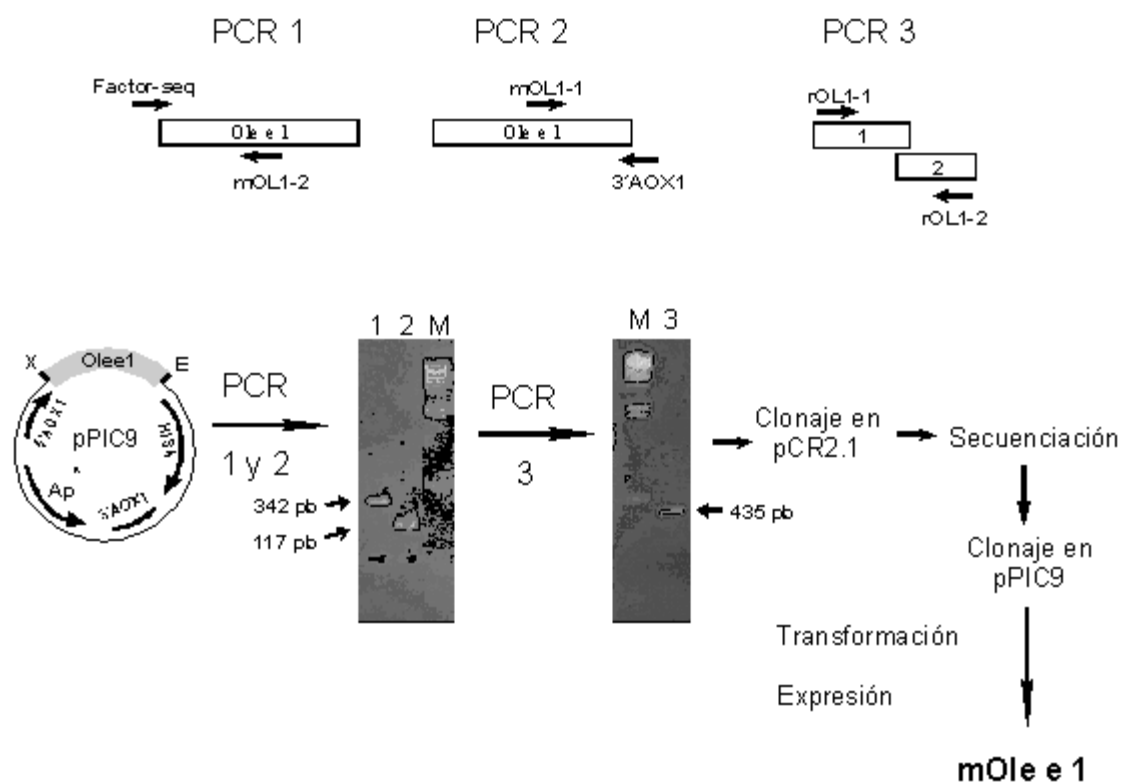


Figura 16: Estrategia empleada para el clonaje y la expresión del alergeno mutante, mOle e 1. Los gels muestran los fragmentos de PCR; 1 y 2, fragmentos de Ole e 1 obtenidos en el primer y segundo PCR, respectivamente; 3, fragmento de PCR que codifica la molécula completa; M, marcadores de tamaño conocido.

La construcción del plásmido recombinante pPIC9/mOlee1 se realizó, de igual forma que para rOle e 1 (figura 4), insertando el fragmento de DNA resultante de la

digestión del plásmido pCR2.1/mOle e 1 con las enzimas *Xho*I y *Eco*RI en los mismos sitios del plásmido pPIC9 de forma que el gen se introdujese a continuación del promotor AOX1 inducible por metanol. Esta construcción se digirió con la enzima de restricción *Bgl*II. El fragmento mayor, que contenía el fragmento de DNA correspondiente a mOle e 1, se purificó y se utilizó para la transformación de células de *P. pastoris* GS115, utilizando el método del acetato de litio.

De todas las células transformantes obtenidas, que mostraron un fenotipo Mut^s, se escogieron seis de ellas más un control negativo (aquel obtenido tras la transformación de las células con el plásmido pPIC9 sin inserto) para ser inducidas con metanol y testar su nivel de producción de proteína, resultando ser el 50% positivas. Puesto que la concentración de la proteína no parecía ser muy diferente, se escogió uno de ellos para analizar la cinética de expresión a distintos tiempos (0, 25, 48, 72 y 96h). Como en el caso de rOle e 1, la máxima producción se conseguía a las 96 h (figura 17A). Para confirmar que la proteína recombinante era mOle e 1, se transfirieron las muestras a membranas de nitrocelulosa y se llevó a cabo la inmunodetección con un anticuerpo monoclonal obtenido frente a nOle e 1, obteniéndose una reacción positiva (figura 17B). Una vez escogidas las condiciones de crecimiento e inducción de las células, se llevó a cabo la producción a gran escala, que produjo un rendimiento de 50 mg del alérgeno mutante por litro de cultivo celular.

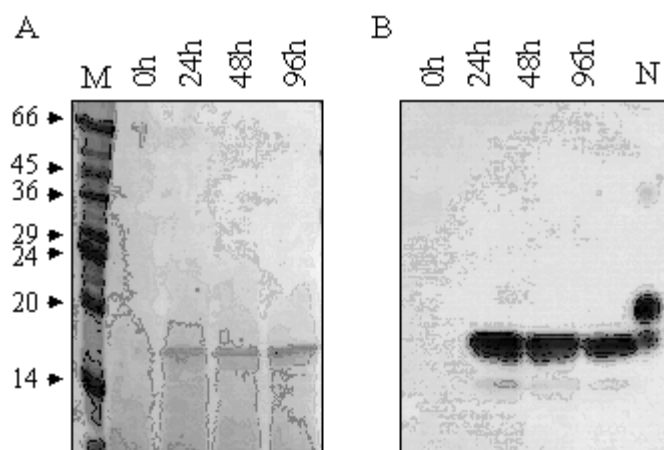


Figura 17: Expresión de mOle e 1 a distintos tiempos de inducción del cultivo, analizados mediante la tinción con azul de Coomassie (A) y en inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal (OL3) obtenido frente a nOle e 1 (B). N, nOle e 1; M, patrones de masa molecular.

Aislamiento del alérgeno mutante de Ole e 1 (mOle e 1)

La purificación de mOle e 1 se llevó a cabo, igual que para rOle e 1, a partir del sobrenadante del cultivo celular dializado, mediante dos etapas cromatográficas, un intercambio iónico en DEAE-celulosa y una de penetrabilidad en Sephadex G-75. En la

primera cromatografía, mOle e 1 eluye a una fuerza iónica de 0,15M en bicarbonato amónico. Después de la cromatografía de penetrabilidad se obtuvo el alergen mutante, mOle e 1 con un alto grado de pureza. En la figura 18 se muestra el análisis electroforético en PAGE-SDS de las fracciones recogidas después de las dos etapas de purificación de mOle e 1. El rendimiento en la producción del alergen mutante, al final de la purificación, es de 15 mg por litro de cultivo celular. El rendimiento es, aunque elevado, un 25% menor que el obtenido en la producción de rOle e 1. Esta diferencia en el rendimiento de la expresión entre rOle e 1 y mOle e 1, podría explicarse teniendo en cuenta la influencia que podría ejercer el oligosacárido en la producción y secreción de proteínas por parte de la levadura *P. pastoris*. Recientemente, los autores Zhu, y col., [1998] han apuntado que la falta de glicosilación puede empeorar el nivel de expresión, alterar la distribución celular y disminuir la eficiencia en la secreción de proteínas por *P. pastoris*.

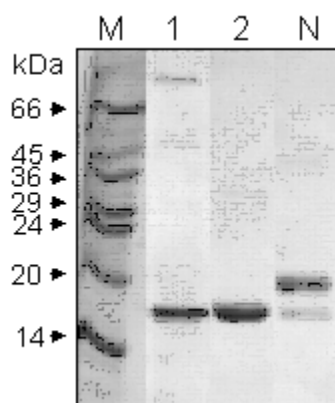


Figura 18: Etapas en la purificación de mOle e 1; después de la cromatografía en DEAE-celulosa (1) y después del Sephadex G-75 (2); N, nOle e 1; M, marcadores de peso molecular.

Caracterización molecular de mOle e 1

El análisis de la secuencia N-terminal del alergen mutante mediante degradación de Edman rindió la secuencia EDVPQ correspondiente a los aminoácidos del extremo amino terminal de nOle e 9, lo que demuestra el correcto procesamiento de mOle e 1. La composición de aminoácidos de mOle e 1 determinada mediante hidrólisis ácida y análisis automático coincide con la secuencia deducida del clon expresado (3c) de Ole e 1.

El alergen mutante, mOle e 1, presenta un masa molecular aparente en PAGE-SDS de 18.5 kDa (figura 18), valor correspondiente al de la forma no glicosilada de nOle e 1. Para confirmar que la proteína producida no había incorporado ningún resto glicosídico a su molécula, se llevó a cabo la reacción con la lectina Con A utilizando como control rOle e 1 (figura 19A). La masa molecular de la forma mutante fue determinada mediante su

análisis por espectrometría de masas. Como se observa en la figura 19B, muestra un sólo pico homogéneo de 16333 Da, prácticamente idéntico que el que mostraba el alérgeno rOle e 1 desglucosilado enzimáticamente con la endoglucosidasa PNGasa F (figura 9), ya que la diferencia en la masa molecular, entre uno y otro, son 39 Da que quedaría dentro del error experimental.

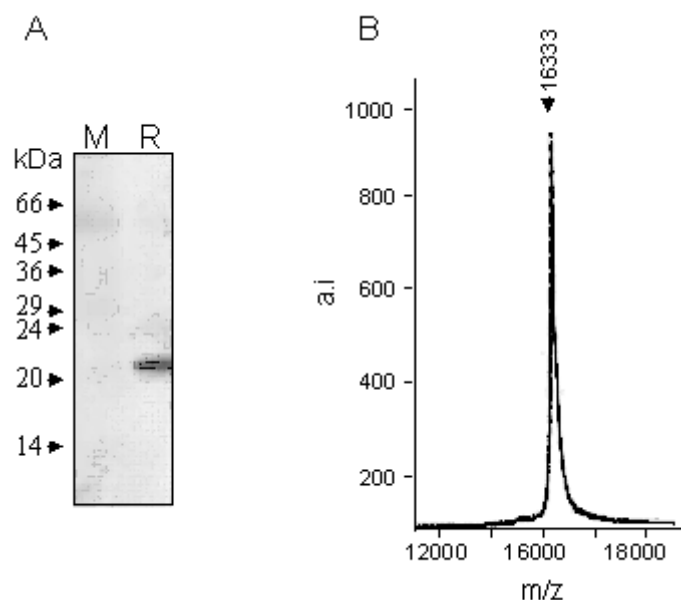


Figura 19: (A) Reacción con Con A de los alérgenos mOle e 1 (M) y rOle e 1 (R) purificados. (B) Espectrometría de masas de mOle e 1. a.i., unidades arbitrarias.

Caracterización espectroscópica de mOle e 1

Para comprobar si la ausencia del componente glicosídico de Ole e 1 afectaba a las características estructurales de la proteína, se han obtenido los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano, así como los espectros de emisión de fluorescencia de los alérgenos recombinantes, rOle e 1 y mOle e 1. Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano (figura 20A) son muy similares para ambas proteínas por lo que no parece haber ningún efecto global en la estructura secundaria causado por la ausencia del azúcar.

Para estudiar posibles cambios a nivel de estructura terciaria en mOle e 1, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia de mOle e 1 y rOle e 1 tras su excitación a 295 nm y a 275 nm. En la figura 20B se observa cómo en el primer caso el espectro es idéntico en ambas proteínas, lo que nos indica que no se ha modificado el entorno del único Trp presente en la molécula. Sin embargo, disminuye ligeramente la emisión de fluorescencia de mOle e 1 después de excitar a 275nm, este hecho indica que con la pérdida del azúcar, el entorno de, al menos una, de sus 5 Tyr ha pasado a ser más polar, lo que podría estar indicando que alguna de sus Tyr se encontraban protegidas del disolvente por el grupo glicosídico. A partir de todos estos resultados se puede concluir que

el alérgeno mutante no glicosilado presenta un plegamiento correcto tanto a nivel de estructura secundaria como a nivel de estructura terciaria.

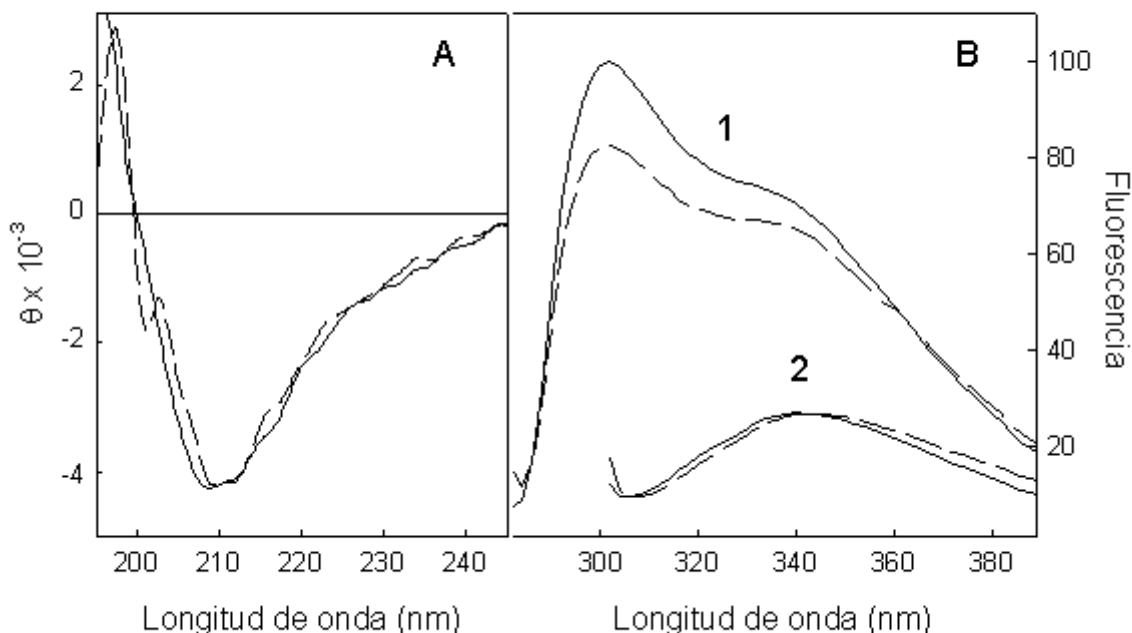


Figura 20: Análisis espectroscópico de Ole e 1 (—) y mOle e 1 (---). (A) Espectros de CD en el UV lejano; los valores se expresan como elipticidad molar por residuo (θ), grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. (B) Espectros de emisión de fluorescencia obtenidos tras excitar a 275 nm (1) y 295 nm (2). Los valores de fluorescencia se presentan en unidades arbitrarias.

Estabilidad térmica

Una de las propiedades más importantes de los alérgenos es su alta estabilidad estructural, siendo en muchos casos una característica intrínseca de estas moléculas. Una forma de evaluar la estabilidad de una molécula es estudiar la variación de la conformación en función de la temperatura. Por tanto y con la finalidad de determinar si se veía afectada la estabilidad térmica del alérgeno por la ausencia del grupo glicosídico, se obtuvieron las curvas de desnaturalización térmica de mOle e 1 y del alérgeno recombinante. La desnaturalización se midió como cambios en la elipticidad molar a 205 nm de la proteína cuando se eleva la temperatura desde 20°C hasta 80°C, siendo el incremento de 30°C/h. Las curvas de desnaturalización térmica resultantes se muestran en la figura 21, a partir de las cuales se ha calculado la temperatura de transición (T_m), que posee un valor de aproximadamente 58°C para ambas proteínas, valor similar al ya obtenido para la proteína natural, 57°C. También se puede observar que las curvas de desnaturalización obtenidas con mOle e 1 y rOle e 1 son muy similares, monofásicas y su forma es sigmoidea, lo que da idea del proceso cooperativo que supone la desnaturalización de Ole e 1.

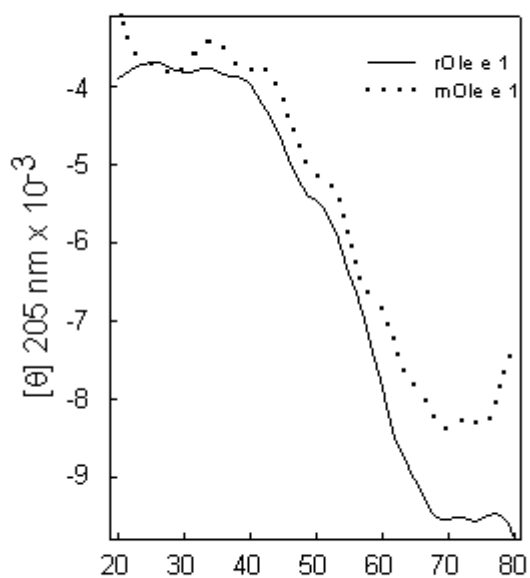


Figura 21: Curvas de desnaturalización térmica de rOle e 1 (—) y mOle e 1 (·····). Se registró la elipticidad molar $[\theta]$ a 205nm. La elipticidad molar por residuo está expresada en grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$.

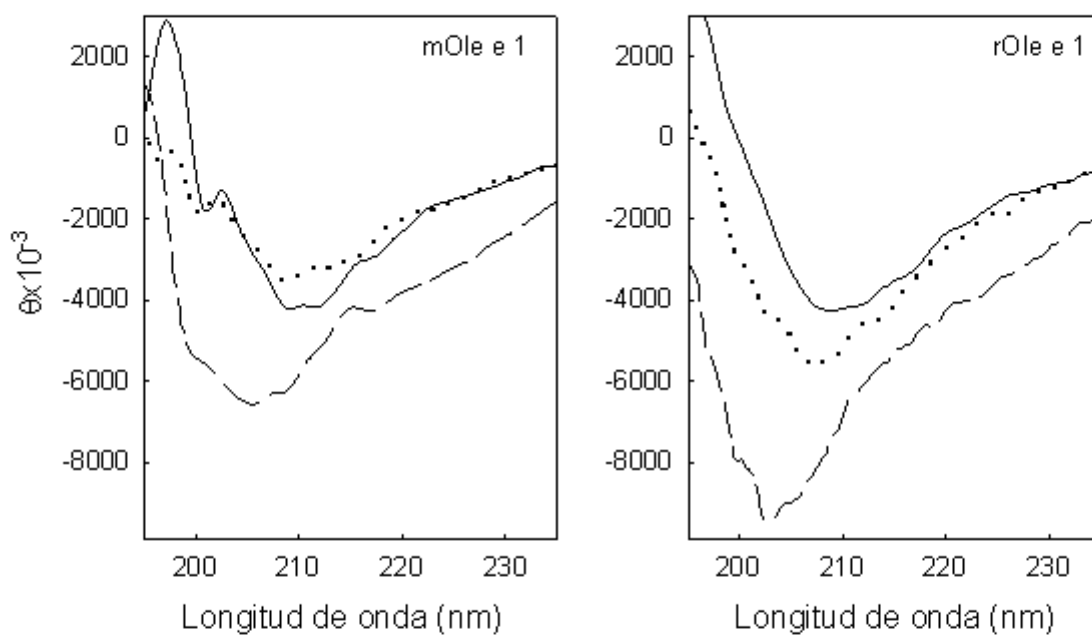


Figura 22: Espectros de CD en el UV lejano de mOle e 1 (A) y rOle e 1 (B) registrados a 20°C (—), tras elevar la temperatura a 80°C (---) y después de recuperar los 20°C (·····). Los valores se expresan como elipticidad molar por residuo (θ), grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$.

Los componentes glicosídicos de las glicoproteínas se encuentran implicados en múltiples funciones biológicas como, por ejemplo, afectando a la velocidad de recambio de la proteína, en la protección frente al ataque de determinadas proteasas, en el proceso de plegamiento, o contribuyendo a la conformación y antigenicidad de la molécula. Hasta la fecha, no se ha determinado el papel biológico del N-oligosacárido de Ole e 1, pero parece que no participa ni en la formación, ni en el mantenimiento de su estructura tridimensional ya que la expresión del alérgeno desglicosilado no afecta notablemente su estructura secundaria, ni terciaria, ni a la estabilidad térmica de la proteína.

Caracterización inmunológica de mOle e 1

Está descrito que en el componente glicosídico de Ole e 1 se encuentra un epítipo con capacidad para unir IgE e IgG [Batanero y col., 1996], la existencia de esta molécula supone una referencia interesante para estudiar más precisamente la implicación del carbohidrato en la antigenicidad y alergenidad de la molécula de Ole e 1.

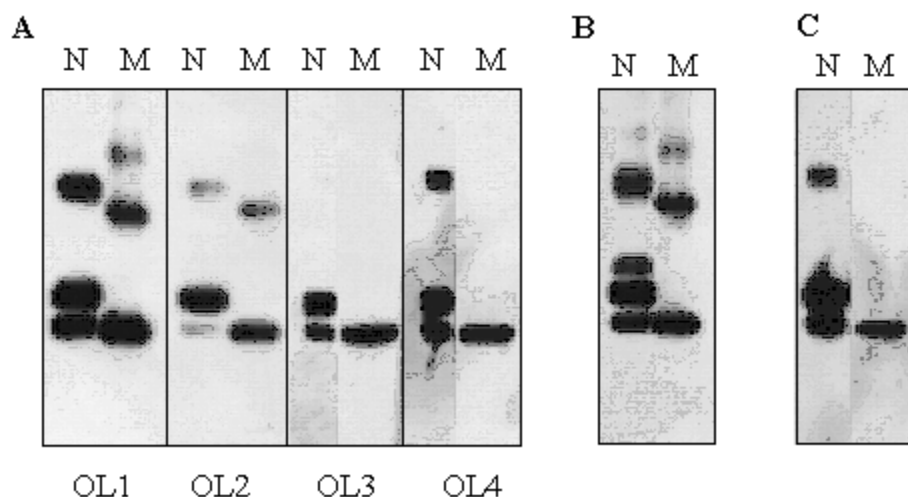


Figura 23: Inmunodetección de mOle e 1 (1 μ g/pocillo) (M) y nOle e 1 (1 μ g/pocillo) (N) con cuatro anticuerpos monoclonales (OL1, OL2, OL3, y OL4) (A); con un anticuerpo policlonal (B) y con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos (C).

Para ello, se ha ensayado, mediante inmunotransferencia, el reconocimiento de cuatro anticuerpos monoclonales obtenidos frente a nOle e 1, de nOle e 1 y mOle e 1 (figura 23A). Todos ellos se unen de igual forma a los dos alérgenos, además, y puesto que tres de ellos (OL-2, OL-3, OL-4) no reconocen a la proteína desnaturalizada como se demostró en la figura 13A de este trabajo, los resultados obtenidos indican que mOle e 1 mantiene los determinantes antigénicos y, por tanto, la conformación nativa necesaria para unirse a estos anticuerpos. Cuando se ha ensayado la capacidad de unión de mOle e 1 a un

anticuerpo policlonal obtenido frente a nOle e 1 se han obtenido los mismos resultados (figura 23B), así como frente a una mezcla de cinco sueros (figura 23C) o frente a 13 sueros individuales de pacientes alérgicos al olivo (figura 24). Estos resultados demuestran que mOle e 1 tiene capacidad para unir tanto anticuerpos IgE como IgG similar a nOle e 1.

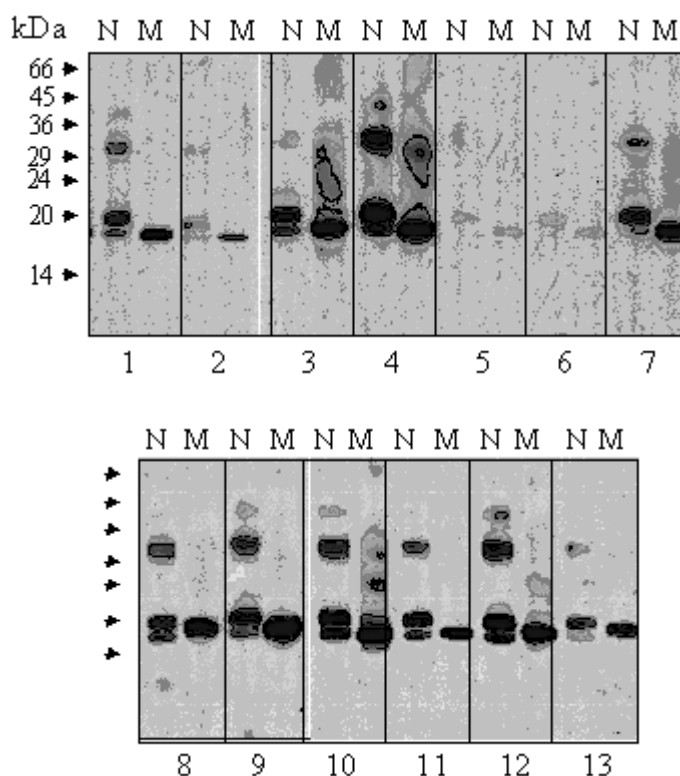


Figura 24: Inmunodetección de los alérgenos nOle e 1 (N) y mOle e 1 (M) con 13 sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo (1-13). Se utilizó 1 µg de proteína por pocillo.

Mediante los ensayos de inmunotinción se puede obtener una idea cualitativa de la unión de IgE al alérgeno, sin embargo no permite cuantificar esta unión. Por esta razón y para medir de forma cuantitativa la unión de IgE a mOle e 1 y nOle e 1, se ha realizado un ensayo de titulación en ELISA con una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos, (figura 25). Si comparamos las curvas de titulación de mOle e 1 y nOle e 1, se observa que son muy similares aunque no solapantes, este hecho podría atribuirse al polimorfismo que presenta nOle e 1 frente a la única molécula expresada, mOle e 1. Comparando las curvas de titulación de rOle e 1 y mOle e 1 se pueden estudiar las diferencias debidas únicamente a la ausencia del azúcar ya que se trata de la misma cadena polipeptídica expresada en el mismo sistema. Como era de esperar la diferencia entre las curvas de titulación de rOle e 1 y mOle e 1 es mínima, luego se puede confirmar el buen plegamiento del alérgeno mutante y se pueden atribuir las diferencias entre éste y el alérgeno natural al polimorfismo que éste último presenta. En cualquier caso, el oligosacárido podría estar influyendo en el

reconocimiento tanto de nOle e 1 como de rOle e 1, luego su ausencia podría dar cuenta de las posibles variaciones observadas en la unión de IgE a mOle e 1.

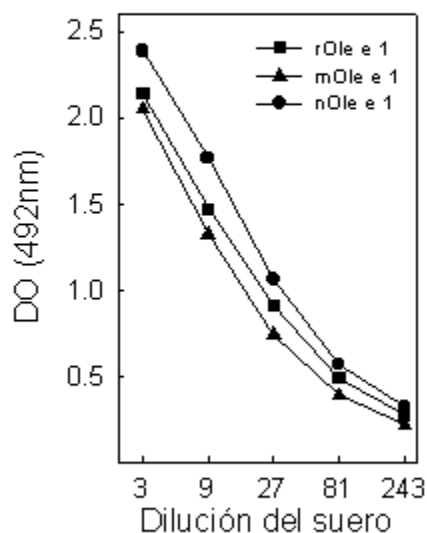


Figura 25: Curvas de unión de IgE de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos, a nOle e 1, rOle e 1 y mOle e 1.

Para comprobar si mOle e 1 era equivalente inmunológicamente a rOle e 1, se realizaron ensayos de inhibición en ELISA, en los cuales se tapizó con una u otra proteína y se inhibió alternativamente con ambas. Como se observa en la figura 27 A y B, ambos alérgenos presentan la misma capacidad para inhibir la unión de anticuerpos IgE al otro, indicando que ambas son capaces de saturar los epítopos IgE de la otra forma del alérgeno.

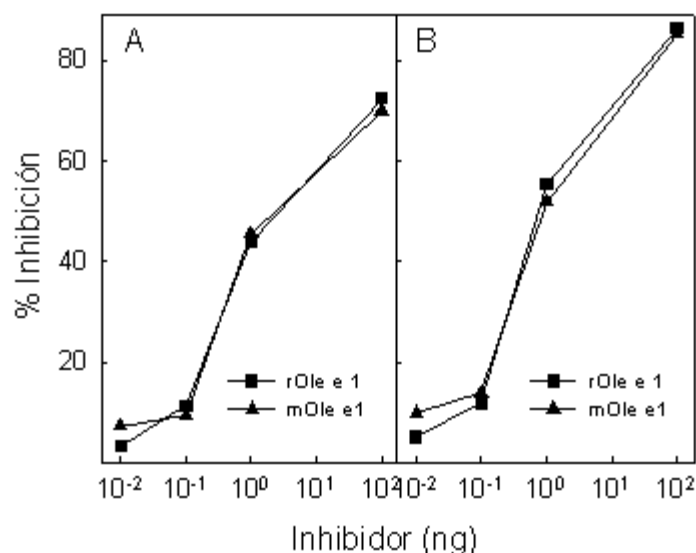


Figura 26: Curvas de inhibición en ELISA de la unión de IgE a rOle e 1 (A) y a mOle e 1 (B) adsorbidos a poliestireno utilizando como inhibidores rOle e 1 (■) y mOle e 1 (▲).

Como conclusión podemos decir que se ha expresado en *Pichia pastoris* una forma mutante desglicosilada del alergen principal del polen de olivo Ole e 1. Esta proteína conserva las propiedades antigénicas y alergénicas de forma similar a nOle e 1. Además la pérdida del componente glicosídico no afecta de forma notable ni a la estructura secundaria ni a la estructura terciaria de la proteína, tampoco modifica su estabilidad térmica. Por todas estas razones, la obtención de mOle e 1 permitiría abordar la determinación de la estructura tridimensional de Ole e 1, algo imposible hasta ahora debido al elevado polimorfismo polipeptídico y glicosídico de Ole e 1 natural, y, probablemente, a la presencia del oligosacárido en el alergen recombinante expresado en *P. pastoris*.

En general, el conocimiento de la estructura tridimensional de un alergen permite ampliar el conocimiento de la proteína tanto a nivel molecular como inmunológico, puesto que facilita la identificación de las zonas de la cadena polipeptídica que quedan en la superficie de la molécula y que, por tanto, pueden ser responsables de la interacción con los anticuerpos IgE. Disponer de esta información podría facilitar, a su vez, el diseño de nuevas estrategias para realizar el mapeo epitópico de este alergen así como para diseñar nuevos productos para inmunoterapia, como pueden ser las formas hipoalergénicas de Ole e 1, bien por mutación del DNA, o por modificación química del alergen, o el diseño de ligandos monovalentes que puedan prevenir la agregación de los receptores y por tanto, reducir la respuesta alérgica.

El conocimiento de la estructura tridimensional de Ole e 1 podría dar información importante sobre características que, aunque se trate de una proteína mayoritaria en el polen de olivo, aún se desconocen sobre este alergen, como puede ser su función biológica. A Ole e 1 se le atribuye un posible papel en la hidratación y/o germinación del polen, pero esta hipótesis se basa en la similitud de secuencia observada con la proteína LAT52 del polen de tomate, para la cual se ha sugerido dicha función [Muschiatti y col., 1994].

La disponibilidad, en fin, de un sistema de producción eficaz de este alergen posibilitaría realizar estudios que de otra forma serían inabordables.

ALERGENOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN EL POLEN DE OLIVO

Detección de un nuevo alérgeno

La diagnosis y, sobre todo, la inmunoterapia requieren un buen conocimiento, completo y exhaustivo, de las moléculas responsables de los procesos alérgicos, por lo que se hace necesario conocer el panel completo (alergograma) de los alérgenos del polen de olivo, desde los más relevantes, es decir, aquellos que son reconocidos por más de un 50% de los pacientes alérgicos al olivo (alérgenos principales) hasta los minoritarios que no por ser reconocidos por un número pequeño de pacientes dejan de ser importantes, ya que pueden causar síntomas muy graves. Hasta la fecha se han aislado y caracterizado, total o parcialmente, ocho alérgenos del polen de olivo, todos ellos con una masa molecular inferior a 35 kDa. Sin embargo, y aunque en estudios anteriores ya se había descrito la existencia de bandas de 46-48 y 60-66 kDa capaces de unir IgE [Vela y col., 1982; Wheeler y col., 1990; Baldo y col., 1992; Waysel y col., 1996; Rodríguez y col., 1998] que podrían constituir alérgenos de gran incidencia, apenas no se tenían datos de los alérgenos de alto peso molecular presentes en esta fuente alérgica.

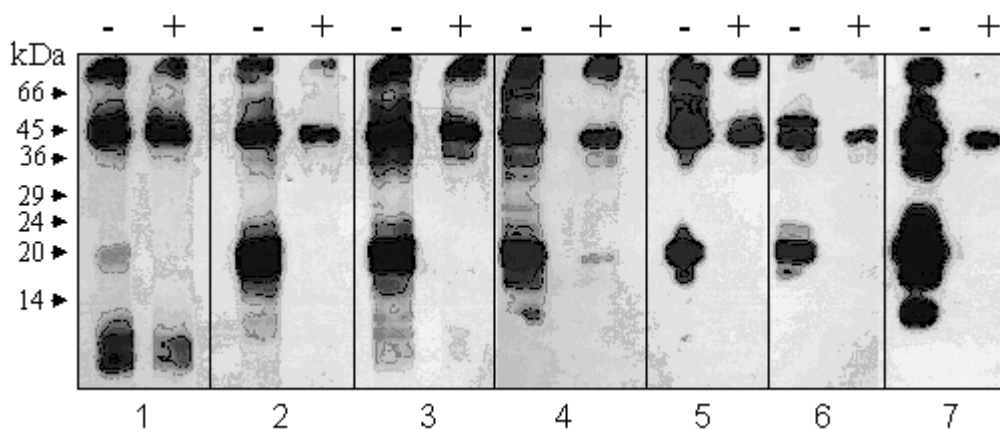


Figura 27: Análisis de la inhibición de la unión de IgE de 7 sueros de pacientes alérgicos al extracto de polen de olivo (40 μ g/pocillo), utilizando como inhibidores: 5 μ g de Ole e 1, 1 μ g de Ole e 3 y 1 μ g de Ole e 6. (-) sin inhibidores, (+) con inhibidores. Los números marcan las posiciones de los patrones de masa molecular.

El estudio mediante inmunotransferencia de la unión de IgE a proteínas del polen de olivo, llevado a cabo con 72 pacientes de Madrid, Córdoba y Jaén, reveló la existencia de una banda proteica de aproximadamente 45 kDa que era reconocida por 44 de estos sueros (61.1%). Este dato indicaba que este alérgeno podría tener una elevada prevalencia entre los pacientes alérgicos al polen de olivo. Con el fin de poder descartar la posibilidad de que esta banda fuera una forma agregada de alguno de los alérgenos previamente descritos, se escogieron siete de los sueros, y se realizaron ensayos de inhibición de la unión

de IgE al extracto de polen de olivo. Como inhibidores se emplearon Ole e 1, Ole e 3 y Ole e 6. El resultado se muestra en la figura 27 donde se puede observar que ninguno de estos alérgenos es capaz de inhibir la unión de anticuerpos IgE a la banda proteica de 45 kDa.

Aislamiento y purificación

Para el aislamiento de este alérgeno se empleó el polen de olivo proporcionado por Biopol ya que su contenido en Ole e 1 es significativamente menor que en el polen proporcionado por la empresa Allergon AB, lo que aparentemente facilitaría la purificación de un alérgeno con una masa molecular de 45 kDa, teniendo en cuenta que Ole e 1 es una proteína mayoritaria en el polen y con tendencia a dimerizar para formar un agregado de 40 kDa.

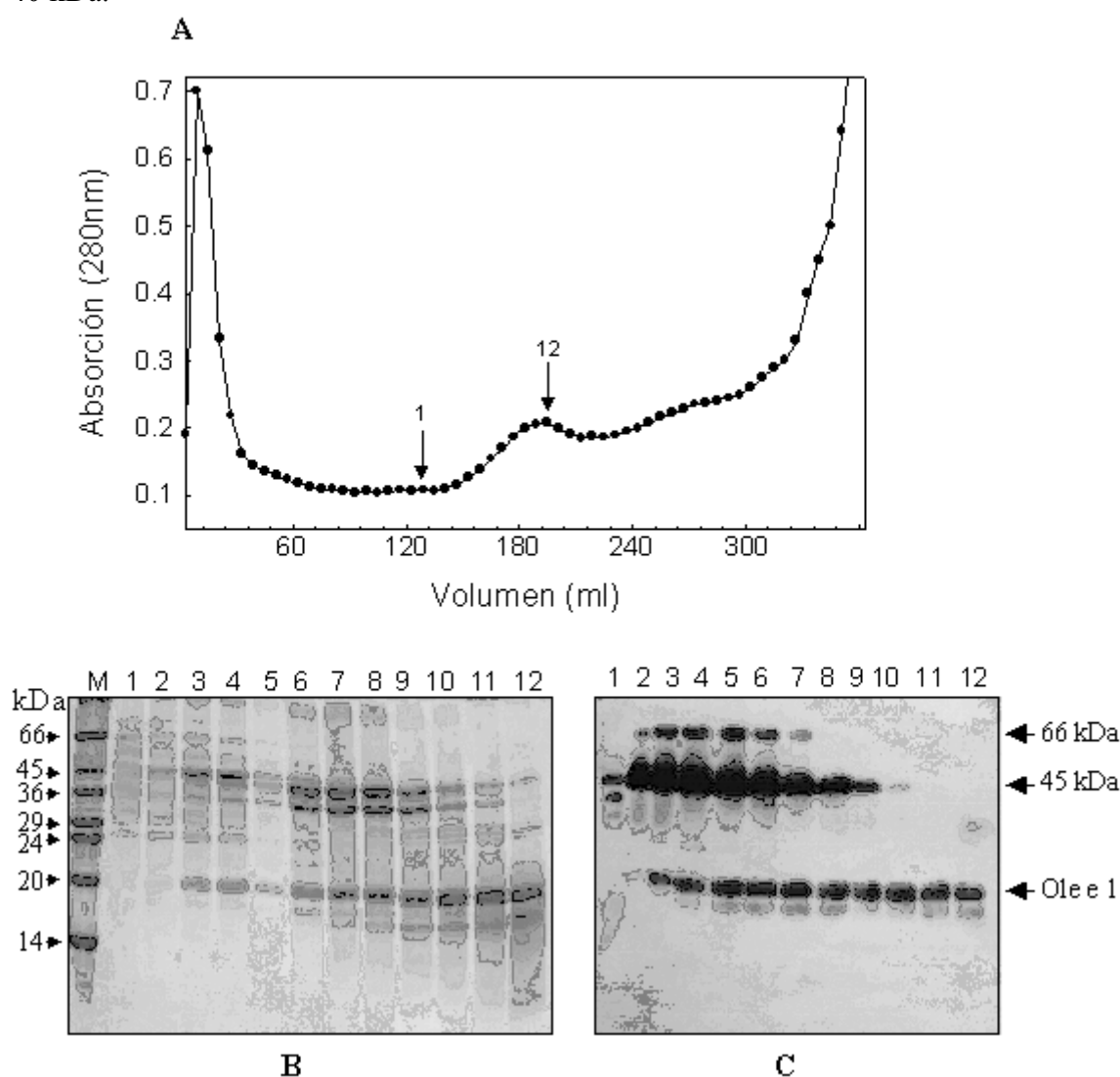


Figura 28: Perfil de elución de la cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-150. La absorción de las fracciones del eluido se registró a 280 nm (A). PAGE-SDS (15%) de las fracciones comprendidas entre las dos señaladas en el perfil con una flecha, detectadas con azul de Coomassie (B) y analizadas con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos (C). M, marcadores de masa molecular.

Este alérgeno fue aislado a partir del extracto salino del polen de olivo mediante tres etapas cromatográficas. En cada etapa, el seguimiento del alérgeno se realizó mediante la inmunotinción de alícuotas de las diferentes fracciones, tras ser sometidas a PAGE-SDS y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Dicha inmunotinción se realizó con una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos a olivo que presentaban reactividad de sus IgE frente a dicho alérgeno. El extracto salino se resolvió, en primer lugar, en una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-150 (figura 28A). En la figura 28B se muestra el análisis electroforético en PAGE-SDS de las fracciones recogidas teñidas con azul de Coomassie, donde se observa que aparecen múltiples bandas siendo las más importantes las que poseen una masa molecular comprendida entre 16 y 66 kDa. De todas ellas, Ole e 1 (20 kDa) y dos proteínas de 45 y 66 kDa son reactivas frente a los sueros de pacientes alérgicos (figura 28C). Las fracciones que contenían proteínas capaces de unir anticuerpos IgE con una masa molecular entre 35 y 50 kDa, se juntaron y liofilizaron. Con el fin de separar mejor el dímero de Ole e 1, de 40 kDa, se llevó a cabo una cromatografía de la muestra en la misma columna de Sephadex G-150. De nuevo, se reunieron las fracciones alérgicas identificadas, y se aplicaron en una columna de afinidad en phenyl-Sepharosa. Tras utilizar un gradiente decreciente en Tris-HCL/NaCl, el alérgeno se eluyó con agua. En la figura 29A se muestra el análisis electroforético de las muestras obtenidas en las diferentes etapas del aislamiento, así como la inmunotinción del alérgeno purificado con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos (figura 29B). El grado de pureza del alérgeno después de la columna de afinidad, determinado por densitometrado de los geles de PAGE-SDS teñidos con azul de Coomassie, es del 93%.

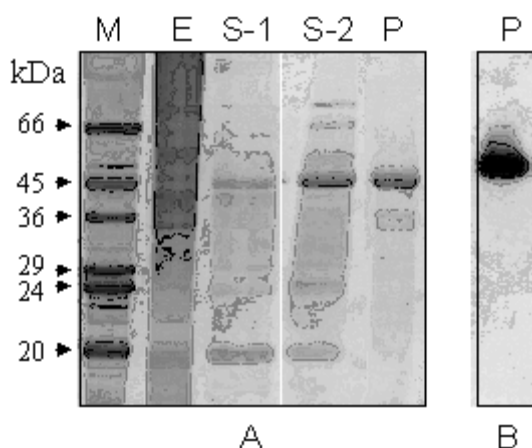


Figura 29: (A) Análisis en PAGE-SDS de las etapas de purificación del alérgeno de 45 kDa. E, extracto total de polen de olivo; S-1, después de la primera cromatografía de penetrabilidad; S-2, después de la segunda cromatografía; P, después de la cromatografía de afinidad en phenyl-Sepharosa. M, marcadores de masa molecular. (B) Inmunodetección con una mezcla de sueros de la fracción recogida después de la phenyl-Sepharosa, P.

Puesto que el nuevo alérgeno purificado es reconocido por las IgEs de pacientes alérgicos al polen de olivo, se le ha asignado el nombre de Ole e 9 según la nomenclatura IUIS [King y col., 1994].

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE Ole e 9

Análisis de la glicosilación

El carácter glicoproteico es una de las características comunes a muchos alérgenos. Por tanto, con el fin de comprobar si la proteína se encontraba glicosilada, se realizó una tinción de la muestra procedente de la cromatografía de afinidad, después de ser sometida a PAGE-SDS y transferida a membrana de nitrocelulosa, con la lectina Con A que une específicamente restos de manosa. El resultado, como se muestra en la figura 31, resultó ser positivo, convirtiéndose en el segundo alérgeno del polen de olivo que, junto con Ole e 1, presenta un grupo glicosídico unido a su cadena polipeptídica. La glicosilación es una característica común entre muchos alérgenos importantes de distintas fuentes biológicas. Como ejemplos de alérgenos glicosilados encontramos Art v 2 del polen de *Artemisia vulgaris* [Nilsen y col., 1991], Api m 1 (PLA₂) en el veneno de avispas [Kubelka y col., 1993], Cry j 1 del cedro del Japón [Hino y col., 1995], Lol p 11 del polen de *Lolium perenne* [van Ree y col., 1998] y Ara h 1 en el cacahuete [de Jong y col., 1998].

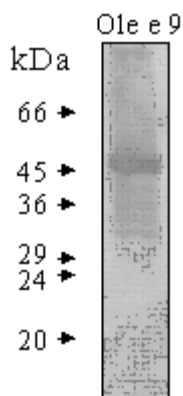


Figura 30: Reacción de Ole e 9 -fracción recogida después de la phenyl-Sepharosa- con Con A.

Criterios de pureza

La homogeneidad del alérgeno purificado se analizó aplicando la muestra en una cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) utilizando un gradiente de acetonitrilo del 35% al 65% en TFA al 0.1%. Como se observa en el cromatograma (figura 31), se obtuvieron dos picos que eluyen a un porcentaje de acetonitrilo elevado: 50 y 52 %. Las dos especies obtenidas en ambos picos, a y b en esta cromatografía, se analizaron por separado para determinar sus características moleculares.

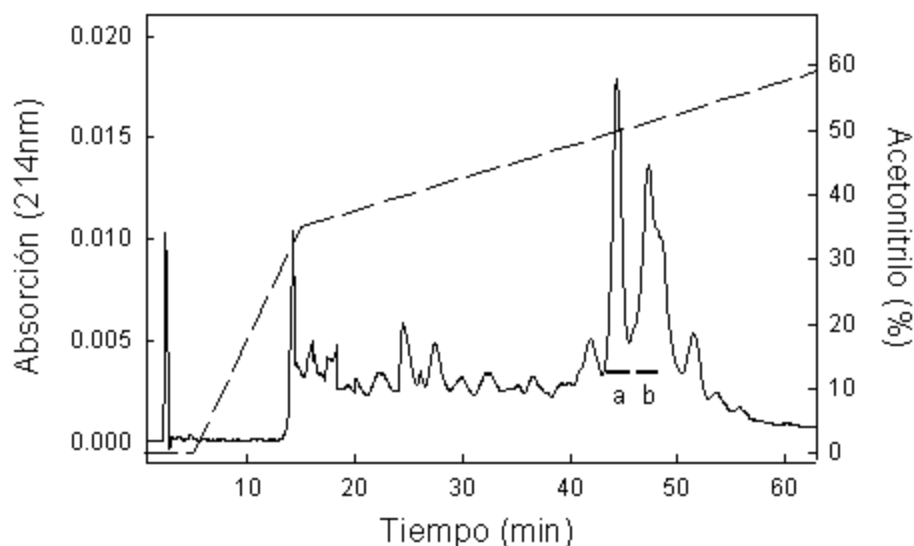


Figura 31: Perfil de elución del alérgeno en RP-HPLC empleando una columna Nucleosil C-18.

Análisis en PAGE-SDS

El análisis electroforético de los dos picos obtenidos tras la cromatografía de RP-HPLC, a y b, demuestra que ambos tienen la misma movilidad en PAGE-SDS, presentando una masa molecular aparente de 45.7 kDa (fig. 32A). En el gel se puede observar, también, una banda con una masa molecular aparente de 93 kDa. Para comprobar si se trataba del dímero de Ole e 9, se realizó la inmunodetección, con una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos, de las proteínas transferidas a membrana, reducidas y sin reducir con -mercaptoetanol. En condiciones reductoras desaparece la banda de alto peso molecular, lo que confirmaría la existencia del dímero que, también, une IgE. Además, el hecho de que el patrón electroforético de la proteína de 45 kDa no se modifique tras el tratamiento con -mercaptoetanol indica la presencia de una única cadena polipeptídica. Sí se observa un aumento en la masa molecular aparente, lo cual es lógico puesto que con la reducción de los posibles puentes disulfuro, se despliega la proteína, dotándole de una conformación más desordenada. También se observa una disminución significativa en el reconocimiento por parte de los sueros de la forma reducida, sobre todo si se tiene en cuenta que, en este caso, a la señal del monómero se debería sumar la que antes aparecía en el dímero. Este resultado indica que el alérgeno presenta epítopos conformacionales que han desaparecido con la desnaturalización de la proteína. En la figura 32B se observa, también, que aunque las dos isoformas presentan capacidad para unir IgE, la primera (pico a en el cromatograma) muestra una mayor unión de estos anticuerpos IgE.

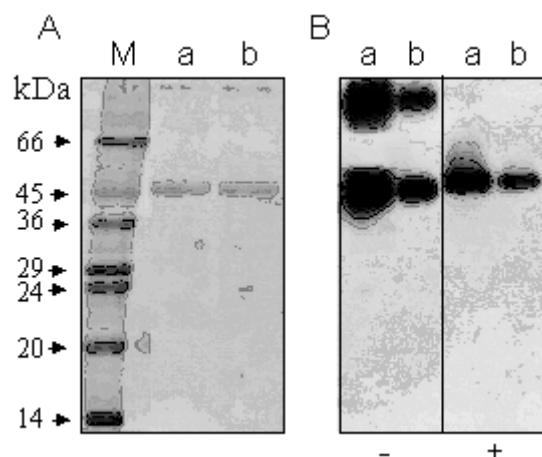


Figura 32: Análisis electroforético en PAGE-SDS (12%) de las muestras obtenidas tras la cromatografía en RP- HPLC, a (4 g) y b (4 g), mediante la tinción con azul de Coomassie (A), e inmunotransferencia (aplicados 1 g) con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos (B), sobre las muestras sin reducir (-) y reducidas con β -mercaptoetanol y tratamiento térmico a 90°C (+).

Determinación de la masa molecular

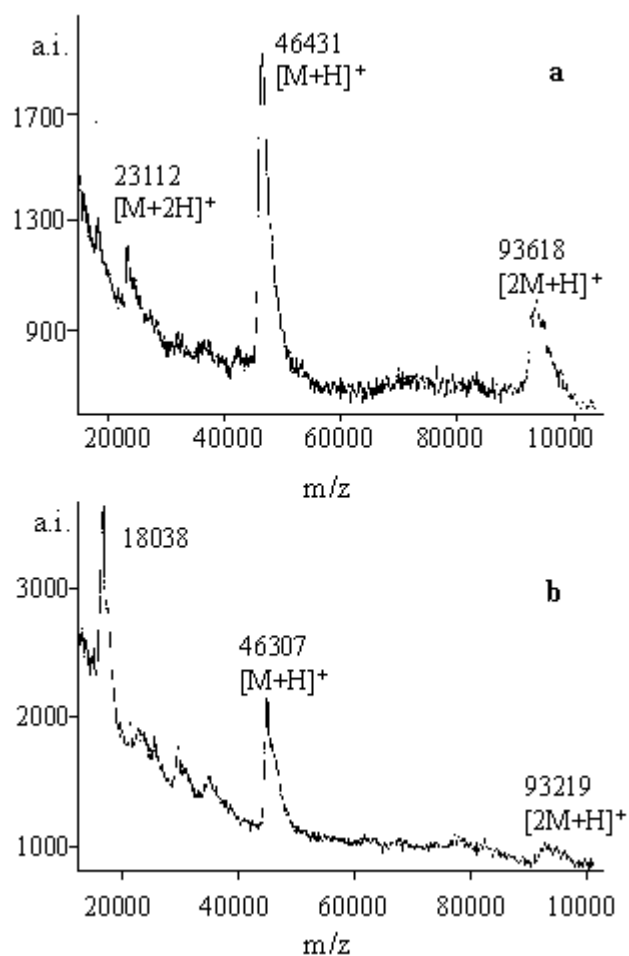


Figura 33: Análisis por espectrometría de masas de las proteínas obtenidas en la cromatografía RP-HPLC.

La masa molecular del alérgeno se determinó mediante espectrometría de masas, empleando para ello las dos especies moleculares, picos a y b, recogidos en la cromatografía RP-HPLC. Los espectros obtenidos para las proteínas muestran picos ligeramente anchos (figura 33), lo que podría ser debido a la existencia de isoformas. El espectro de la primera molécula (a) presenta un máximo a 46431 Da y el espectro de la segunda (b) muestra un máximo a 46307 Da.

Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de ambas proteínas se determinó mediante hidrólisis ácida y análisis automático. La tabla 11 muestra los resultados obtenidos como porcentaje molar de cada uno de los residuos en la proteína completa, así como el número de residuos determinados basándose en el peso molecular calculado por espectrometría de masas (46.4 y 46.3 kDa) y un valor medio de masa por residuo de 115 Da.

Tabla 11: Composición de aminoácidos de las dos isoformas aisladas de Ole e 9.

Aminoácido	Ole e 9a		Ole e 9b	
	%	Nº de residuos	%	Nº de residuos
Cys*		6		6
Asx	13.2	56	13.2	56
Thr	6.6	28	6.5	28
Ser	8.2	35	7.7	33
Glx	8.1	34	7.5	32
Pro	7.1	30	8.7	37
Gly	9.9	42	9.5	40
Ala	9.1	39	8.7	39
Val	6.0	26	6.6	27
Met	2.5	10	2.4	10
Ile	3.9	17	3.9	17
Leu	8.4	36	8.3	35
Tyr	4.1	17	4.0	17
Phe	4.7	20	4.6	20
His	1.7	7	1.92	7
Lys	5.6	24	5.42	23
Arg	0.7	3	0.7	3
Trp	nd	nd	nd	nd
Total		430		430

nd: no determinado

* determinado por oxidación con ácido per fórmico

Como se puede observar, la composición de aminoácidos resultó ser muy similar para ambas especies, lo que sugiere que son isoformas de la misma proteína. De la composición de aminoácidos de este nuevo alérgeno cabe destacar la presencia de 6 cisteínas algunas de las cuales podrían encontrarse formando puentes disulfuro en la molécula.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la proteína aislada presenta polimorfismo y que las dos especies separadas en el HPLC son, por tanto, isoformas de la misma proteína que presentan, a su vez, distinta capacidad de unión a los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos.

Determinación parcial de la estructura primaria de Ole e 9

La secuencia NH_2 -terminal de Ole e 9 no se pudo determinar por degradación de Edman, debido al bloqueo originado por modificación del residuo que ocupa la primera posición en la cadena polipeptídica.

Con el fin de obtener algún segmento de secuencia interna de Ole e 9, se utilizó un método alternativo: se procedió a digerir la proteína con tripsina. Los péptidos obtenidos se separaron mediante una cromatografía de RP-HPLC (figura 34). Posteriormente, se obtuvo la secuencia NH_2 -terminal, mediante degradación de Edman, de 6 de esos picos. La tabla 12 muestra las secuencias obtenidas de los seis péptidos analizados. Para el pico P4 se obtuvieron dos secuencias, que pueden distribuirse de la forma representada en la tabla debido a los distintos rendimientos recogidos en cada ciclo para cada uno de ellos.

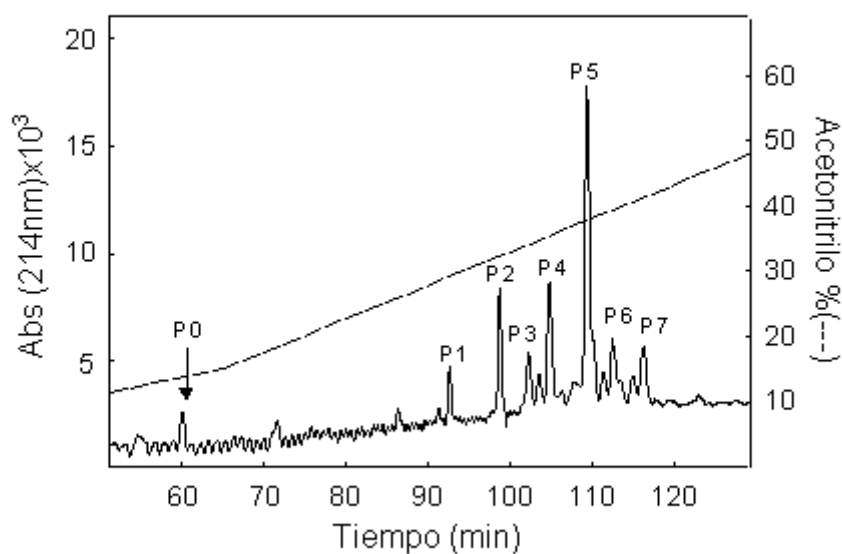


Figura 34: Perfil de elución en RP-HPLC (columna Nucleosil C_{18}) de la digestión de Ole e 9 con tripsina.

Tabla 12: Secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos tras la digestión de Ole e 9 con tripsina.

Péptido	Secuencia
P0	NTQNPTTPAT
P1	AYVGNLINHLK
P2	DIEIVVAETG
P3	VSTVHAMAVLSQSYPPSSGV
P4	SIDTYLFSLY / YFGLFKPDGS
P5	AAGSWXVPKPGVSDDQLTGNINYAXSQG

X: indeterminado

Estas secuencias se introdujeron en el banco de datos GenBank/EMBL y se analizó su homología con otras proteínas resultando que podían ser alineadas con enzimas α -1,3-glucanasas de plantas. La secuencia de todos los péptidos se podía alinear con un mayor o menor grado de similitud, con un elevado número de glucanasas de distintas especies y tejidos. Sin embargo, el péptido P5 sólo mostraba homología con cuatro α -1,3-glucanasas: con Wh-Ta, enzima de punto isoelectrico ácido presente en la raíz del trigo [Hird y col., 1993], y con las α -1,3-glucanasas básicas de *Brassica napus* (Bn-A6), de *Arabidopsis thaliana* (At-A6) ambas específicas de anteras [Cruz-Ortega y col., 1997], y de *Salix gilgiana* (Sg-GN1), siendo con Wh-Ta con la que presentaba una mayor identidad. La diferencia entre estas cuatro glucanasas y todas las demás descritas hasta la fecha, es la presencia de un extremo COOH-terminal más largo formado por 100-120 residuos. La secuencia del péptido P5 se alineaba, precisamente, con dicha extensión. Por lo tanto, se podrían distinguir dos clases de enzimas, “cortas” y “largas”, dependiendo de la longitud de la cadena polipeptídica. Como ejemplo, de las glucanasas “cortas” se ha seleccionado para la figura la enzima de *Hordeum vulgare* (Hv-Gv).

Las α -1,3-glucanasas son enzimas hidrolíticas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y aunque su función biológica precisa se desconoce, se las ha relacionado con enzimas de defensa de plantas frente a patógenos (pathogenesis-related proteins o PR-proteins), debido a la inducción de la expresión de sus genes en plantas infectadas y a su capacidad para romper los enlaces α -1,3 presentes en glucopolímeros que forman parte de la pared de hongos y otros microorganismos [Antoniw y col., 1980; Stintzi y col., 1993; Van Loon y col., 1994]. Con posterioridad, se han descubierto genes de α -1,3-glucanasas que se expresan durante procesos del desarrollo de plantas sanas tales como la germinación [Casacuberta y col., 1992], la senescencia [Hanfrey y col., 1996] y la floración [Lotan y col., 1989; Ori y col., 1990; Cote y col., 1991; van Eldik y col., 1996].

Péptidos	-----	-
Wh-Ta	MPLLILMLLLAAGAAGAESATPSLHIGVNYGANADNLPSPSTSVATFLATKTTIDRVKLFDAAMP TFISAF	70
HV-Gv	-----MGAVHGVCYGMVGDNLPSRSDVVQLYKSRN-IHAMRIYNPDQEAL TALLR	48

Péptidos	-----	-
Wh-Ta	GTPISLAVSLPNSALPALADKATGLDAARSWIRANLSPYVPATNVTLLLAGNEILS TDTNLI LSLPAM	140
HV-Gv	GSGIFLILDVGG--VDEVRLGRDPSYAAGWVRNVAAYYDPVLI RYLAVGNEVPAGDTG----IILLAM	112

	P3	
Péptidos	-----VSTVHAMAVLSQS-YPPSSGV-----	20
Wh-Ta	RRLAQALKAEGLTG-VRVTTPHYLCILAPSDGIPSNASFRAGYN TKLF PAM LQFHEDTGSPFMVN PYPYF	209
HV-Gv	QNVHNALASANLSSSIKVVSTAVRFDVITNSF-PPSSGVFRDPSC---LVPIARFLDSTGAPFLANVYPYF	178

	P2	
Péptidos	-----DIEIVVAETGW-----	31
Wh-Ta	SYRPET-----LNYALFRPNSGIYDPATKLNYSMLDAQMDATYTAMKKLCYGDVDIAVCEAGWPTQAE	274
HV-Gv	AYFDDRGQNI RLNYATLQPGCTVRDNGNGLTYTSLFDAMVDSIYAALEKAGTPNVRVWVSESCWPSAG--	246

	P1	P4a	P4b	
Péptidos	-----AYVGNLIMHLR-----SIDTYLFSLY-----YFGLFKPDGS-----	62		
Wh-Ta	GQICVGVQEARDFNEGMI RVCSSGKCTPLMPNRTFETYLFSLFDENQKPGPIAERHFGLFNPDPFTPVYDL	344		
HV-Gv	-GFGASVENARNYNQGLIDHIRS--GTPKRP G-AIETTYI FAMFNENRKP GD EFERNFGLF FPMKQPVYPT	312		

	P0	P5	
Péptidos	-----NTQNPTTPAT-----AAGSWCVKPKGVSDDQLTGNIYACSQG-----	100	
Wh-Ta	GLLRDGASVAPTSPNPSPNPSPKPAPSGGCKWCVAKDGANGTDLQNNIYACGF-VDCRPIQSGGACFS	413	
HV-Gv	TFPN-----	316	

Péptidos	-----	166
Wh-Ta	PNSLQAHA SYVMNAYYQANGHTDLACDFKCTGI VTS SDPSYGGCKYVS	461
HV-Gv	-----	-

Figura 35: Alineamiento, según Altschul y col. [1997], de la secuencia de los péptidos trípticos de Ole e 9 con dos enzimas -1,3-glucanasas: Wh-Ta y Hv-Gv. En rojo se marcan los residuos conservados en los péptidos y en alguna de las dos secuencias.

CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DE Ole e 9

En la figura 36 se muestra la estrategia empleada para el clonaje y la secuenciación del cDNA que codifica Ole e 9. Para ello fueron necesarias varias etapas de PCR utilizando como molde el cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado del polen de olivo. En esta aproximación, se empleó el *kit* SMART RACE cDNA que permite la síntesis del cDNA de doble hebra a partir del RNA total, usando los cebadores 3 CDS o SMART-II. La selección de uno u otro cebador depende del extremo del gen cuya amplificación se quiera dirigir y posteriormente se quiera clonar, 3 o 5 respectivamente. Los oligonucleótidos que se emplearon son los descritos en la tabla 2. Los tres primeros (OL9A, OL9B y OL9C), se diseñaron degenerados a partir de la secuencia de los péptidos trípticos. Todos los fragmentos de DNA obtenidos en cada etapa de PCR se clonaron en el vector pCR 2.1 y se secuenciaron.

A partir de la secuencia del péptido tríptico P3 se diseñó el cebador OL9C (5' → 3'), y a partir de la secuencia de P5 se diseñaron los cebadores OL9A (3' → 5') y OL9B (5' → 3'). En la primera reacción de amplificación, en la que se emplearon los cebadores OL9C y OL9A, se obtuvo un fragmento de 700 pb que codificaba para una región interna de la proteína. Con los cebadores OL9B y 3' CDS, se amplificó un fragmento de 485 pb. Con esta segunda reacción de amplificación se consiguió determinar la secuencia de nucleótidos que codifica para el carboxilo-terminal de Ole e 9, así como la secuencia 3' no codificante hasta la cola de poliA. Con las dos primeras etapas de PCR se había conseguido obtener una secuencia compuesta, en total, por 1100 nucleótidos.

A partir de esta secuencia obtenida se diseñaron nuevos cebadores específicos, esta vez, no degenerados: OL9D (5' → 3'), OL9E (3' → 5') y OL9F (3' → 5'). OL9D se utilizó para reamplificar de nuevo el extremo 3' y confirmar la secuencia obtenida anteriormente. Con el fin de obtener la secuencia NH₂-terminal se llevaron a cabo dos reacciones de amplificación con los cebadores OL9E, OL9F y SMART-II. En la primera reacción se obtuvo un fragmento de 657 pb y en la segunda un fragmento de 722 pb. Se secuenciaron ambos lo que permitió obtener junto con la secuencias obtenidas anteriormente, la secuencia completa de DNA que codifica para la proteína Ole e 9.

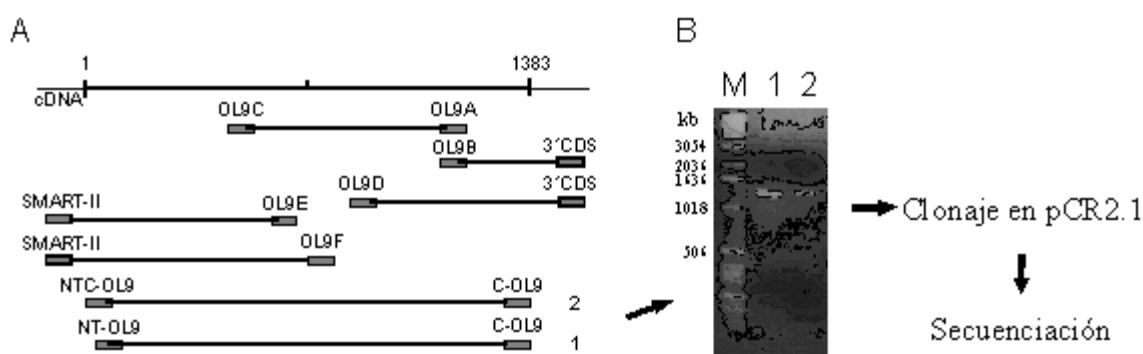


Figura 36: Estrategia del clonaje de Ole e 9. (A) Etapas de PCR realizadas con los distintos cebadores (). (B) El gel muestra los fragmentos de DNA obtenidos en las dos últimas etapas de PCR. M, patrones de tamaño conocido; región codificante de Ole e 9 sin péptido señal (1) y con él (2).

En la figura 37 se muestra la secuencia completa de nucleótidos del gen de Ole e 9, junto con la secuencia de aminoácidos deducida. La región codificante son 1380 nucleótidos que codifica para 460 aminoácidos. La secuencia se analizó utilizando un método predictivo para detectar el sitio de procesamiento de la proteína madura [Nielsen y col., 1997]. Según esta predicción, Ole e 9 se procesaría entre la Ser-26 y la Gln-27, luego presenta un péptido señal formado por 26 aminoácidos. Este dato sugiere que Ole e 9 es una proteína de secreción al medio extracelular. Como se ha comentado en la introducción de

este trabajo, las -1,3-glucanasas, proteínas con las que el alérgeno presenta homología, se pueden clasificar en distintos grupos dependiendo, entre otras cosas, de su localización celular, sólo las de la clase I (pI básico y de longitud cortas) se localizan en las vacuolas, siendo las demás secretadas al medio extracelular (clase II, III y IV). Por otro lado, el hecho de que el primer aminoácido sea una Gln explicaría la imposibilidad de obtener el extremo NH₂-terminal mediante degradación de Edman, ya que este aminoácido se cicla de forma espontánea a piroglutamato.

```

1  AAAAAACAAATTATTTTCGTTTTCCAACCTATTCTTAACCTAAAGCAGATAGCCATACAGATGGCTGCAAAT
                                                                M A A N      4
73  GTGCAAAACATCTTCTCTACTCTTCCTGGTTTTCTTTTACTACAAAACCTTTTACTCGCAAATTCACAATCA
    V Q T S S L L F L V F L L L Q N F Y S A N S Q S      28
144  TTTTGGGAGTAAATTATGGGCAATTAAGCGACAACCTCCCTTCGCTTCAGGCGACGGTGAACCTTTTGAAG
    F L G V N Y G Q L S D N L P S L Q A T V N L L K      52
219  TCCACAACCATCCAAAGGTTAGGCTCTTCGGTGTGAGCCAGCAGTCATTAAAGCGTTTGCAAACACCGGC
    S T T I Q K V R L F G A E P A V I K A F A N T G      76
291  GTTGAAATTGTGATAGTTCGACAATGGCGATATTCCACGTTAGCTTCCAACCCAAATGTAGCAAGTCAG
    V E I V I G F D N G D I P T L A S N P N V A S N      100
363  TTTGTGAAATCCAATGTGATGTCTTCTATCCGGCGAGCAATATTATAGCCATCACCGTTGGTAATGAGGTA
    F V K S N V M S F Y P A S N I I A I T V G N D V      124
435  TTGACATCAGGAGATCAAAAGCTCATCTCTCAACTCTTGCCAGCAATGCAAAATGTCCAAATGCCCTGAAT
    L T S G D Q K L I S Q L L P A M Q N V Q N A L N      148
507  GCCGCTTCATTGGGTGGGAAAGTTAAGGTCTCGACGGTGCACGCGATGGCTGTGTTAAGTCAGTCATATCCT
    A A S L G G K V K V S T V H A M A V L S Q S Y P      172
579  CCTCAGGAGTTTCAACCCCTGGATTAGGTGACACAATGAAGGCATTGCTTCAATCCAGAGTGCAAAT
P S S G V F N P G L G D T M K A L L Q F Q S A N      196
651  GATGCACCTTTTATGATCAGTCCATACCCCTACTTCGCATACAAAACCAGCCAACGCTGATACATTGGCA
    D A P F M I S P Y P Y F A Y K N Q P T P D T L A      220
723  TTCTGCCTTTTCCAACCTAATGCTGGGCAAGTCGACTCTGGAATGGTCACAAGTACACGAATATGTTTCGAT
    F C L F Q P N A G Q V D S G N G H K Y T N M F D      244
795  GCACAGGTTGATGCTGTGCACTCTGCCTTAAATGCAATGGGATTCAAGGATATTGAGATCGTAGTTGCTGAG
    A Q V D A V H S A L N A M G F K D I E I V V A E      268
867  ACTGGGTGGCCTCACGGAGGAGACTCCAATGAAGTTGGCCCAAGCTTGGACAATGCAAAAGCCTATGTTGGA
T G W P H G D S N E V G P S L D N A K A Y V G      292
939  AACTTGATAAACCACTCAATCAAAAGTCGCACCCACTTATGCCTGGAAAATCAATTGACACCTACCTC
N L I N H L K S K V G T P L M P G K S I D T Y L      316
1011  TTTTCACTTTATGACAGGATAAGAAAACCGGGGCAAGCTCAGAGAAATATTTTGGACTTTTCAAGCCAGAT
F S L Y D E D K K T G A S S E K Y F G L F K P D      340
1083  GGTTCGACGACTTATGATGTCGGTCTCCTAAGAACACACAGAATCCAACAACCTCCAGCAACACCAACCCCA
G S T T Y D V G L L K N T Q N P T T P A T P T P      364
1155  ACACCAAAAGCAGCAGGATCTTGGTGTGTACCCAAACCTGGAGTCTCTGATGATCAGTTGACGGGAAATATT
    T P K A A G S W C V P K P G V S D D Q L T G N I      388
1227  AACTATGCCTGTGGCAGGGGATTGATTGCGGGCCAATTCAGCCAGGAGGTGCCTGTTTGAACCAAACT
N Y A C S Q G I D C G P I Q P G G A C F E P N T      412
1299  GTAAAAGCACACGCTGCTTATGTGATGAATCTTTACTATCAATCTGCCGGAAGGAATTCTTGAACCTGTGAC
    V K A H A A Y V M N L Y Y Q H A G R N S W N C D      436
1371  TTCTCGCAGACAGCCACTCTCACTAATACTAATCCTAGTTACGGAGCTTGCAATTTTCCAGTGGCAGTAAC
    F S Q T A T L T N T N P S Y G A C N F P S G S N      460
1443  TGAAGGATGAGGAAATTTTGTATTGCTAAATAATTAGTAGAGATGTAGTAGTTTCCGAAGTGGTTCTGAAA
1515  CATAAGGCCCAATATTAGTTTATGTAAGCTAATAATGAATTTTCAATTGTATTTCATGACACTTTATTGAA
1587  TAAAGGATATTTTTGTATTTCTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 37: Secuencia de nucleótidos de Ole 9 junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Se subrayan las regiones que se obtuvieron con la secuenciación de los péptidos tripticos. () sitio predictivo para el procesamiento. El subrayado doble marca los sitios potenciales de glicosilación.

Tabla 13: Composición de aminoácidos de Ole e 9.

Aminoácido	N° de aminoácidos determinados por:		
	Análisis de aminoácidos		Secuenciación*
	Ole e 9a	Ole e 9b	
Cys	6	6	7
Asx	56	56	58
Thr	28	28	30
Ser	35	33	37
Glx	34	32	31
Pro	30	37	32
Gly	42	40	38
Ala	39	39	40
Val	26	27	30
Met	10	10	9
Ile	17	17	17
Leu	36	35	33
Tyr	17	17	17
Phe	20	20	20
His	7	7	7
Lys	24	23	23
Arg	3	3	2
Trp	nd	nd	3
Total	430	430	434

* determinado para la proteína madura

La masa molecular y el punto isoelectrico calculado de forma teórica a partir de la secuencia de aminoácidos, excluyendo el péptido señal, fue 46044 Da y 5.62, respectivamente, valores que se correlacionan bien con los obtenidos para la proteína purificada (46.4 y 46.3 kDa, para las isoformas aisladas). La composición de aminoácidos obtenida a partir de la estructura primaria coincide, también, con la calculada mediante la hidrólisis ácida de la proteína (tabla 13).

El alérgeno presenta dos posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones 355 y 447, que se encuentran formando parte de la secuencia consenso Asn-X-Thr/Ser. De estos dos sitios, al menos uno se encuentra glicosilado como se ha demostrado mediante la reacción positiva de la proteína con la lectina Con A.

Posteriormente, se diseñaron dos nuevos cebadores: NTC-OL9 y CT-OL9, correspondientes al extremo 5' y 3' terminal, respectivamente, del DNA codificante de Ole e 9. Ambos incluyen un sitio de restricción para facilitar más adelante su clonaje en un vector de expresión. Con estos dos cebadores se llevó a cabo otra reacción de

amplificación, en la que se obtuvo la región codificante del alérgeno completa, que se clonó en el vector pCR 2.1. Cuatro de los clones obtenidos fueron secuenciados.

OLE42	MAANVQISSLLPLVPLLQMFYSAN	SQSPFGVTCQL	SDMLPSLQATVWLKSTTIQXVRLP	GAEPVAVIKAFAN	TCVEIVICFDMGDIPLASMPNVA	SQ	100
OLE49	100
OLE45	100
OLE49	100
OLE47	100
OLE12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	74
OLE6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	74
OLE21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	74
OLE2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	74

OLE42	FVKSNVMSFPASMTIATVQNEVL	ISGQQLISQLL	PANQNVQNALNAASLQKXKVS	IVHANA	VL	SQSYPPS	SGVFPNPGCG	INXALLQFPQ	SANDAPF	200
OLE49	200
OLE45	200
OLE49	200
OLE47	200
OLE12	174
OLE6	174
OLE21	174
OLE2	S.....	G.N.....	174

OLE42	MISPYFPAYXNQ	PIPDILAPCLPQ	PNAGQVDSQWGH	KYIMFPAQVDA	VHSALNAGCFKD	IEIVVAETQWPHCG	DSNEVQPSL	DNKAYVQGL	INHLXS	300
OLE49	300
OLE45	300
OLE49	300
OLE47	300
OLE12	274
OLE6	274
OLE21	P.....	274
OLE2	274

OLE42	XVGTPLMPCKSID	TYLPSLYDQKX	IQASSEKYPCLP	KPDGSI	TYDQGL	LXMTQWPTT	PAIP	IPTPKAAGS	WCV	PKPGVSD	DL	IGMINYAC	SQGI	DCGP	400
OLE49	400
OLE45	400
OLE49	400
OLE47	400
OLE12	374
OLE6	374
OLE21	374
OLE2	374

OLE42	IQPCZACFEP	MTVKAHAAYVQGL	YYQHACRMSWNC	DF	SQITAIL	INTMPS	YGACNFP	SGSW	460
OLE49	S.....	460
OLE45	460
OLE49	460
OLE47	460
OLE12	434
OLE6	434
OLE21	434
OLE2	S.....	434

	N° de cambios	%Identidad
OLE42	2	99.6
OLE49	1	99.8
OLE45	1	99.8
OLE49	1	99.8
OLE47	1	99.8
OLE12	0	100
OLE6	0	100
OLE21	3	99.2
OLE2	7	98.4

Figura 38: Secuencias de aminoácidos deducidas de los clones de cDNA de Ole e 9 obtenidos mediante amplificación por PCR. Los puntos () indican identidad respecto a la secuencia superior; Ole9, secuencia obtenida mediante la secuenciación de los fragmentos de PCR. También se muestran el número de cambios y el % de identidad de cada clon con respecto al superior.

Por otro lado, y teniendo en cuenta el sitio de procesamiento, se diseñó otro cebador, NT-OL9, que correspondía a la secuencia de siete residuos a partir del primer aminoácido de la proteína madura que, junto con CT-OL9, sirvió para obtener la región codificante de Ole e 9 madura. El fragmento de DNA se clonó en el vector pCR 2.1 y se seleccionaron

cuatro nuevos clones para ser secuenciados. El poseer el DNA correspondiente a la preproteína y a la proteína madura facilitaría la selección posterior del método a utilizar para expresarla.

Tabla 14: Características moleculares de los clones secuenciados de Ole e 9.

Clones	Masa molecular (Da)	Punto isoelectrico	Cambios en la secuencia
OLE48	46043.7	5.62	---
Olee9	46043.7	5.62	S G, H S
OLE45	46120.8	5.62	N T
OLE49	46047.7	5.62	P T
OLE47	45940.6	5.62	C S
OLE12	46043.7	5.62	---
OLE6	46043.7	5.62	---
OLE21	46138.9	5.97	G F, D P, A V
OLE2	45896.4	5.00	N S, D G, K N, A T, K E, S G, H S, K D

Tras la secuenciación de los ocho clones completos, cuatro conteniendo el péptido señal y otros cuatro con la secuencia de la proteína madura, se analizaron los cambios en la secuencia de nucleótidos, algunos de los cuales eran silenciosos y otros, sin embargo, conducían a cambios en la secuencia de aminoácidos. En la figura 38 se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de estos clones, así como la deducida por secuenciación de los distintos fragmentos obtenidos por PCR para completar el clonaje de Ole e 9, comparadas con el clon OLE48. Se escogió este clon como referencia puesto que dos de los otros clones secuenciados tienen exactamente la misma composición aminoacídica que éste, lo que sugiere que podría ser el mayoritario. Se puede observar que aparecen heterogeneidades en varias posiciones, lo cual estaría en concordancia con el polimorfismo observado en la proteína a partir del perfil de RP-HPLC (figura 31), como en el análisis de aminoácidos (tabla 11). Cabe destacar que aparecen más cambios en la secuencia obtenida de los clones sin péptido señal, lo que hace pensar que podría haber más heterogeneidades que no se están detectando al haber condicionado la selección de estas secuencias a partir del péptido señal. Aparecen cambios en 14 posiciones a lo largo de la secuencia, manteniéndose en todas ellas los dos sitios potenciales de glicosilación. Todos los clones tienen siete cisteínas en las posiciones 222, 273, 392, 398, 407, 435 y 453, salvo el clon 47, cuya única variación respecto a la secuencia obtenida más frecuente es la sustitución de la Cys 453 por una Ser. En la tabla 14 aparecen algunas características moleculares de estos clones, como son la masa molecular y el punto isoelectrico calculados

de forma teórica a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína madura. Cabe destacar que todos los clones salvo dos, mantienen exactamente el mismo punto isoeléctrico.

El polimorfismo que aquí se confirma como una característica molecular de Ole e 9 es extensible al caso de muchos alergenos de plantas y, concretamente, en el polen de olivo se han descrito, también, otros alergenos que lo manifiestan. Ole e 1 posee heterogeneidades en 37 posiciones de su estructura primaria [Villalba y col., 1993; Villalba y col., 1994], Ole e 3 presenta 2 cambios en la secuencia de aminoácidos [Ledesma y col., 1998] y en Ole e 8 se han detectado 5 [Ledesma, 2000]. El polimorfismo de alergenos se ha podido determinar en los últimos años gracias a las técnicas de clonaje y secuenciación del cDNA específico habiéndose encontrado isoformas en muchos de ellos, como por ejemplo en Lol p1 de *L. perenne*, Amb a 1 de *A. artemisiifolia*, Par j 1 de *P. judaica* y Cyn d 1 de *C. dactylon* [Pérez y col., 1990; Groffith y col., 1992; Duro y col., 1997; Chang y col., 1999]. Estas isoformas pueden variar en pocos aminoácidos o en más de un cuarto de la secuencia completa. Otro ejemplo puede ser el alergeno principal del polen de abedul, Bet v 1, para el que se han descrito hasta 20 isoformas presentando, algunas de ellas, baja capacidad para unir IgE, pero alta capacidad para estimular células T [Snowboda y col., 1995; Ferreira y col., 1996]. En el otro extremo se encuentran los alergenos de pólenes de gramíneas como Lol p 1, Lol p 2 y Lol p 3 que existen como múltiples formas isoalergénicas [Johnson y Marsh, 1965]. Por tanto, la determinación de las isoformas de un alergeno no sólo es un valioso dato a nivel científico que completa la caracterización de la proteína, sino que puede tener gran relevancia clínica, puesto que la sustitución de algunos aminoácidos en la estructura primaria pueden cambiar notablemente su antigenicidad, así hay estudios que apuntan hacia el posible uso de isoformas hipoalergénicas en inmunoterapia [Ebner y Ferreira, 1997].

Las enzimas α -1,3-glucanasas, con las que Ole e 9 presenta homología, también se caracterizan por presentar distintas isoformas [Leubner-Metzger y Meins, 1999] que pueden variar en número. Por ejemplo, de la enzima Sp41 específica del estilo del tabaco se han detectado dos isoformas [Ori y col., 1990] y de la enzima de cebada, se han detectado hasta seis isoformas denominadas desde Hv-GI a Hv-GVI [Xu y col., 1992].

Homología de secuencia

El alineamiento de la secuencia completa de Ole e 9 con otras α -1,3-glucanasas de distintas especies (figura 39) confirmó la homología propuesta previamente. En la tabla 15 se muestran los porcentajes de identidad y de similitud entre las distintas secuencias considerando la región que se puede alinear.

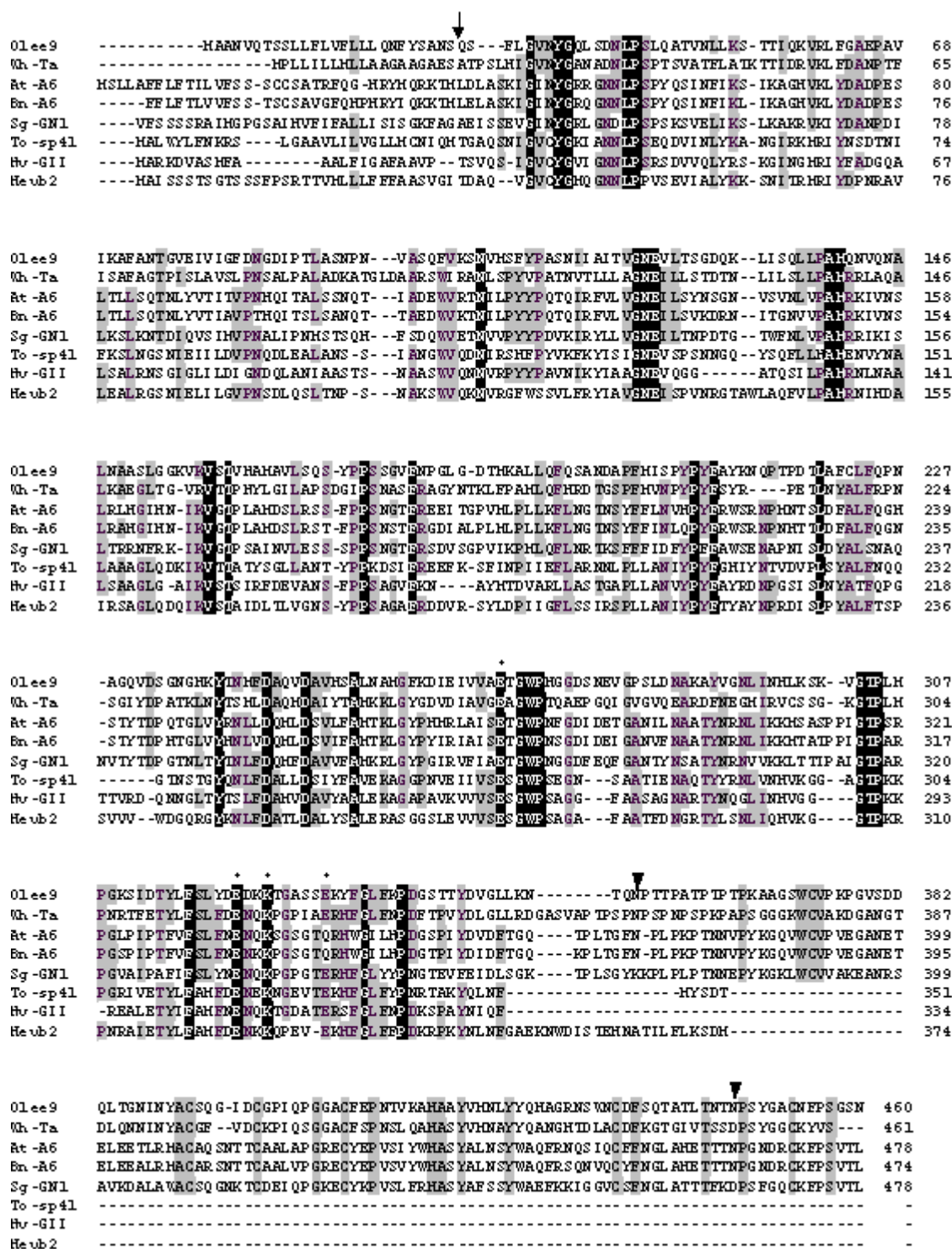


Figura 39: Alineamiento de la secuencia de Ole e 9 con -1,3-glucanasas de *Triticum aestivum* (trigo) (Wh-Ta), de *Arabidopsis thaliana* (At-A6), de *Brassica napus* (colza) (Bn-A6), de *Salix gilgiana* (sauce japonés) (Sg-GN1), de *Nicotiana tabacum* (tabaco) (To-Sp41), de *Hordeum vulgare* (cebada) (Hv-GII) y de *Hevea brasiliensis* (látex) (Hev b 2). En negro se resaltan los residuos conservados en todas las secuencias y en gris los conservados en, al menos, cuatro de ellas. Los guiones (-) indican los huecos introducidos en el alineamiento. Se señala el sitio teórico de procesamiento de Ole e 9 (), los residuos catalíticos (*) propuestos por Chen y col. [1995] y los sitios potenciales de glicosilación () para Ole e 9.

Tabla 15: Porcentajes (%) de identidad y similitud de secuencia entre Ole e 9 y proteínas homólogas.

SIMILITUD

	Ole e 9	Wh-Ta	At-A6	Bn-A6	Sg-GN1	To-sp41	Hv-GII	Hev b 2
Ole e 9		58	51	51	52	55	53	50
Wh-Ta	39		48	49	48	47	49	45
At-A6	32	32		93	70	54	52	48
Bn-A6	31	32	84		70	52	52	47
Sg-GN1	33	32	51	50		53	52	49
To-sp41	34	29	32	31	29		60	65
Hv-GII	35	34	32	31	34	42		58
Hev b 2	30	30	27	27	28	48	47	

IDENTIDAD

Como se puede observar, la mayor identidad la presenta con una α -1,3-glucanasa presente en la raíz del trigo (Wh-Ta) la cual posee un punto isoeléctrico ácido [Cruz-Ortega y col., 1997], y con las α -1,3-glucanasas básicas de *Brassica napus* (Bn-A6), de *Arabidopsis thaliana* (At-A6) ambas específicas de anteras [Hird y col., 1993], y de *Salix gilgiana* (Sg-GN1) específica del amento de las flores masculinas [Futamura y col., 2000]. Ole e 9, así como estas cuatro proteínas, tienen una extensión en el extremo COOH-terminal, rica en Cys y Pro con una longitud entre 108 y 112 residuos, de la que carecen el resto de las enzimas α -1,3-glucanasas descritas hasta la fecha [Leubner-Metzger y Meins, 1999]. Como ejemplo de éstas últimas, se ha utilizado en el alineamiento la enzima de cebada (Hv-GII) [Xu y col., 1992] y la enzima To-sp41 del estilo del tabaco [Lotan y col., 1989]. En la figura se incluye, también, la secuencia del alérgeno del látex Hev b 2 [Sunderasan y col., 1995; Chye y Cheung, 1995], único alérgeno descrito como α -1,3-glucanasa y por tanto, único alérgeno con el que Ole e 9 presenta homología. La similitud entre Hev b 2 y Ole e 9 no es muy elevada (30% de identidad, 50% de similitud), sobre todo si comparamos con la que presentan otros alérgenos del polen del olivo, como Ole e 1 y Ole e 3, con sus alérgenos homólogos, en otras oleáceas o en especies no relacionadas filogenéticamente como las gramíneas, ya que los valores oscilan entre el 81 y el 98%.

En la región COOH-terminal de Ole e 9, se encuentran situados los dos sitios consenso potenciales de glicosilación. Wh-Ta, Bn-A6 y Sg-GN1 tienen también dos sitios posibles de glicosilación en esa zona, y At-A6 tres. Estas enzimas presentan, además, otros lugares posibles de glicosilación repartidos a lo largo de su secuencia. La enzima Sp41, α -1,3-glucanasa "corta" posee un sitio de glicosilación en el extremo COOH-terminal y otros tres repartidos a lo largo de la molécula, habiéndose demostrado, mediante la reacción positiva con Con A, que se encuentra glicosilada [Ori y col., 1990]. Además, Hev b 2 posee un sitio potencial de glicosilación al final del extremo carboxilo, no habiéndose estudiado

su carácter glicosilado [Sunderasan y col., 1995; Chye y Cheung, 1995]. La glicosilación es una propiedad que las proteínas que aquí se presentan no comparten con las demás α -1,3-glucanasas descritas hasta la fecha, aunque se sabe que las de clase I (pI ácido y cortas) se producen como pre-pro-proteínas con un péptido señal hidrofóbico en el extremo NH₂-terminal y una extensión glicosilada en el extremo COOH-terminal que se elimina en la proteína madura [Shinshi y col., 1988].

Por otro lado, no se puede descartar el procesamiento de un péptido corto del extremo COOH-terminal de Ole e 9, teniendo en cuenta, por un lado las masas moleculares del alérgeno obtenidas experimentalmente (46.4 y 46.3 kDa) y a partir de la secuencia deducida de la proteína madura (46 kDa) y la masa molecular (892 Da) que sumaría el grupo glicosídico mínimo (NAcGlu₂Man₃) unido a una Asn de una secuencia consenso; tanto más si se consideran dos sitios glicosilados y con oligosacáridos más complejos. Además, la pérdida de un péptido corto podría implicar a la última Cys de la cadena polipeptídica, lo que podría explicar el hecho de que mediante la oxidación con ácido performico y posterior análisis de aminoácidos de Ole e 9, sólo se detectasen seis Cys y no las siete determinadas tras la secuenciación de los distintos clones. En cualquier caso, tampoco habría que descartar que el procesamiento del extremo NH₂-terminal implicase algunos residuos más de los predichos por el método de Nielsen y col. [1996], aunque parece más improbable puesto que implicaría residuos que se encuentran conservados en otras α -1,3-glucanasas (figura 39).

Otro dato que hay que destacar al comparar las distintas secuencias es que las seis Cys se encuentran en posiciones conservadas en las cinco α -1,3-glucanasas “largas”, encontrándose todas ellas localizadas en el extremo COOH-terminal, luego podrían tener un motivo tridimensional común en esta región. También resulta interesante comprobar que las enzimas “largas”, salvo Wh-Ta, se encuentran localizadas en tejidos reproductivos de las plantas. Estas enzimas de mayor longitud no se adaptan a ninguno de las clases estructurales propuestas para las α -1,3-glucanasas, luego podríamos encontrarnos frente a una nueva clase de estas enzimas.

La familia de α -1,3-glucanasas incluye una proteína de látex para la que se han descrito propiedades alergénicas. Se trata de Hev b 2 alérgeno que pertenece al grupo de las α -1,3-glucanasas cortas y básicas. Este alérgeno es polimórfico, presentando masas moleculares aparentes entre 35-38 kDa. Estas características moleculares lo alejan de Ole e 9 que es una α -1,3-glucanasa “larga” (46 kDa) de punto isoeléctrico ácido. sin embargo, no puede descartarse algún tipo de reactividad cruzada entre estos dos alérgenos, extremo que será preciso explorar en un futuro.

En la tabla 16 se resumen algunas de las características moleculares de las α -1,3-glucanasas homólogas a Ole e 9 que han sido empleadas en el alineamiento. Se puede observar la variabilidad tanto en el tamaño como en el pI. De todas las α -1,3-glucanasas “largas” descritas, tan sólo Ole e 9 y Wh-Ta presentan un punto isoeléctrico ácido.

Tabla 16: Resumen de algunas características moleculares de las proteínas homólogas a Ole e 9.

Glucanasa	Nº de aminoácidos		Mw (kDa)		pI
	a	b	a	b	
Ole e 9	460	434	46.0	49.0	5.62
Wh-Ta	461	436	46.0	48.9	6.00
At-A6	478	455	52.0	52.9	9.20
Bn-A6	474	453	52.0	53.5	9.20
Sg-GN1	478	440	49.0	52.0	9.27
To-sp41	351	319	35.7	39.2	5.61
Hv-GII	334	306	32.0	35.2	10.0
Hev b 2	374	349	36.0	41.3	9.50

a, incluyendo el péptido señal

b, considerando la proteína madura

Predicción de estructura secundaria de Ole e 9

La predicción de estructura secundaria se llevó a cabo basándose en la estructura primaria del alérgeno y aplicando los métodos de Garnier y col., [1996] (figura 40). Los resultados de dicha predicción dan un 18.9% hélice, 23.5% lámina y 57.6% conformación aperiódica. El patrón de estructura secundaria muestra una alternancia entre hélice y lámina en los primeros 320 aminoácidos de la cadena polipeptídica.

```

ccccccccccccchhhhhhhhhccchhhhhhccchhhhhhccccceeeeecccccccecccc
QSFLGVNYGQLSDNLPQLATVNLKSTTIQKVRFLGAEPVIAKAFANTGVEIVIGFDNGDIPTLASNP 70
ccccccccceeeeeccccceeeeeccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccceeeeeeeee
VASQFVKSNVMSFYPPASNI IAITVGNEVLTSQDQKLISQLLPAMQNVQNALNAASLGKVKVSTVHAMAV 140
ccccccccceccccchhhhhhhhhccccccccccccccccccccccccceeeeecccccccecccc
LSQSYPPSSGVFNPGLDTMKALLQFQSANDAPFMISPYFYAYKNQPTPDTLAFCLFQPNAGQVDSGNG 210
ccceehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccceeeeeccccccccccccccccchhhhhhhhhhhcccccc
HKYTNMFDAQVDAVHSALNAMGFKDIEIVVAETGWPFGGDSNEVGPGLDNKAYVGNLINHLKSKVGTPL 280
ccccccccceeeeeccccccccceeeeeccccccccceeeeecccccccccccccccccccccccc
MPGKSIDTYLFSLYDEDKKTGASSEKYFGLFKPDGSTTYDVGLLKNTQNPTTPATPTPTPKAAGSWCVPK 350
ccccccccccccceccccccccccccccccccccccccceeeeeeeeeeeeeccccccccccccceee
PGVSDDQLTGNINYACSQGIDCGPIQPGGACFEPNTVKAHAAYVMNLYYQHAGRNSWNCDFSQTATLTNT 420
cccccecccccc
NPSYGACNFPSSGN 434

```

Figura 40: Predicción de estructura secundaria de Ole e 9, siendo hélice (*h* en azul), lámina (*e* en rojo), y ordenación aperiódica (*c* en verde). Los residuos catalíticos y los sitios de N-glicosilación están señalados en negrita.

Esta distribución da lugar a un motivo estructural típico de las enzimas glicosil-hidrolasas [Juers y col., 1999] al que se denomina barril / o, en inglés, “TIM barrel”.

Este nuevo dato estructural apoya, una vez más, la pertenencia de Ole e 9 a la familia de las glicosil-hidrolasas, uno de cuyos miembros es la α -1,3-glucanasa. El extremo COOH-terminal formado por los últimos 108 aminoácidos tiene, principalmente, estructura aperiódica, siendo en esta región donde se encuentran los dos sitios potenciales de glicosilación, así como seis de las siete Cys que tiene la molécula. Los residuos catalíticos propuestos por Chen y col. [1995] quedan distribuidos de la siguiente forma: el Glu-268 nucleófilo en la lámina 7 y el Glu-331 donador de protones en la lámina 8, la situación de estos residuos en la estructura secundaria está conservada en todas las enzimas α -1,3-glucanasas [Varghese y col., 1994].

Predicción de antigenicidad e hidrofilia

A partir de la secuencia de aminoácidos deducida de Ole e 9 se ha obtenido su perfil de hidrofobicidad (figura 41) según el programa descrito por Kyte y Doolittle [1982] donde se puede observar que tienen un extremo NH₂-terminal muy hidrofóbico formado por 26 aminoácidos, que correspondería al péptido señal. También se observa que los primeros 300 aminoácidos, incluyendo el péptido señal, tienen un mayor carácter hidrofóbico por lo que podrían estar formando parte de una estructura más empaquetada que los 150 residuos del extremo COOH-terminal que tiene un carácter más hidrofílico. El perfil de hidrofobicidad es muy similar al descrito para la α -1,3-glucanasa del estilo del tabaco Sp41 [Ori y col., 1990].

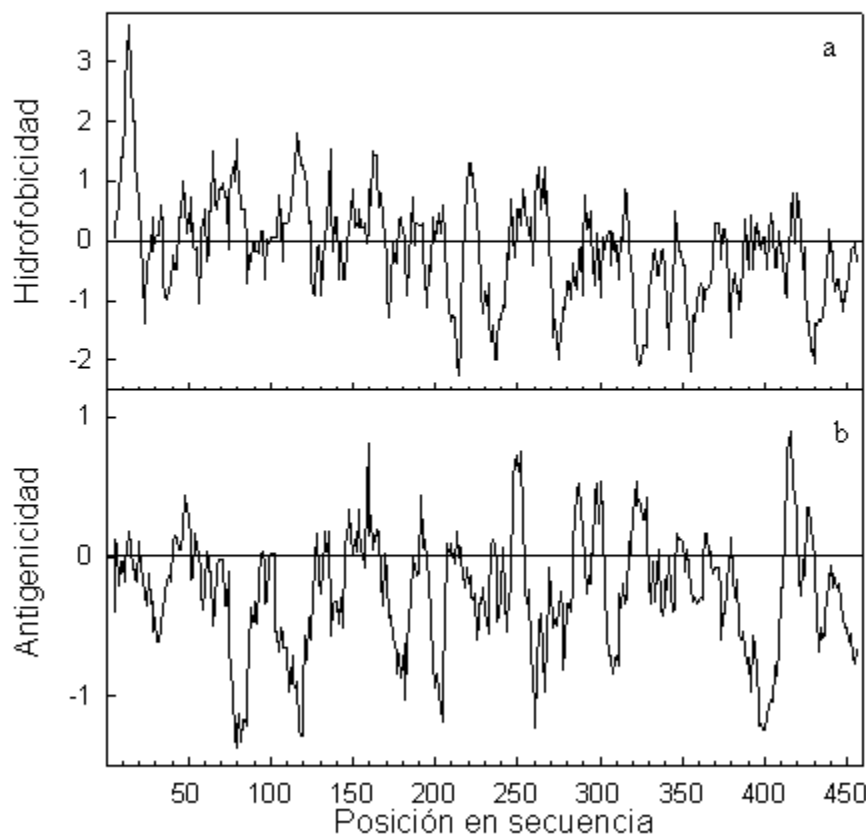


Figura 41: Predicciones teóricas sobre la estructura de Ole e 9. (a) Perfil de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle, [1982]. (b) Perfil de antigenicidad según Welling y col. [1985].

La predicción de antigenicidad mediante el método de Welling y col., [1985] sugiere la existencia de cinco regiones potencialmente antigénicas, que podrían contribuir a la formación de epítomos B. Estas regiones serían las comprendidas entre los residuos 145-166, 247-253, 284-302, 319-329 y 412-429.

ANÁLISIS FUNCIONAL DE Ole e 9: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA α -1,3-glucanasa

El mecanismo catalítico propuesto para las enzimas α -1,3-glucanasas se muestra en la figura 42 [Chen y col., 1993; 1995]. El centro activo lo forman una tetrada de aminoácidos ionizables: Glu-268, Glu-322, Lys-325 y Glu-331 (posiciones correspondientes a Ole e 9; ver figura 39).

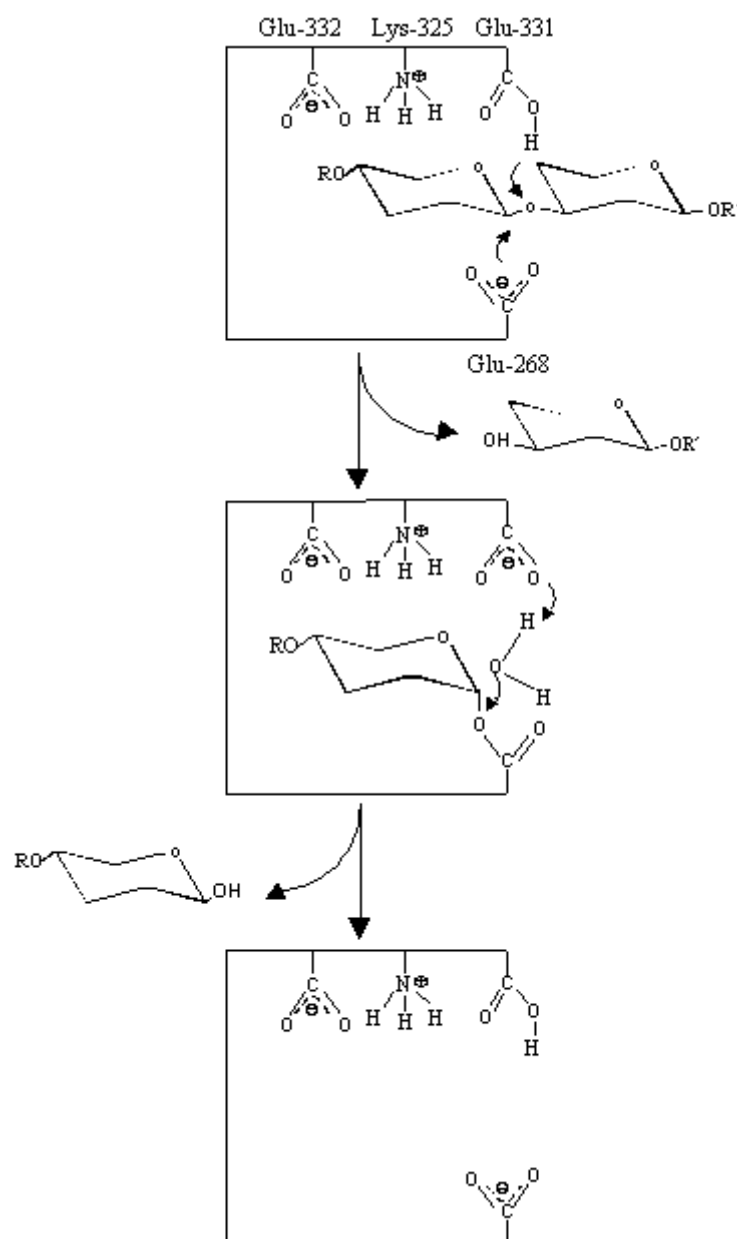


Figura 42: Mecanismo catalítico propuesto para las enzimas α -1,3-glucanasas por Chen y col. [1995]. Las posiciones marcadas en los residuos son las correspondientes a Ole e 9. El pH óptimo de actuación es 4.5

El Glu-331, como ácido débil, actuaría protonando el oxígeno glicosídico y el Glu-268 actuaría como nucleófilo estabilizando, mediante un enlace covalente transitorio, el estado intermedio. El mecanismo por el cual Glu-322 y Lys-325 ejercen su influencia está por determinar, aunque es posible que estos dos residuos formen un par iónico que podría ayudar a estabilizar la carga negativa que se establece en el Glu-331 durante la protonación del átomo de oxígeno glicosídico [Chen y col., 1995].

Puesto que estos residuos implicados en la catálisis enzimática se conservaban en Ole e 9, se procedió a medir *in vitro* la actividad α -1,3-glucanasa del alérgeno. Para ello se empleó como sustrato un polímero de glucosas unidas por enlaces α -(1,3), la laminarina, y se midió la actividad como la cantidad de glucosa liberada por minuto. El alérgeno purificado muestra una actividad específica de 38.9 ± 5.6 mg de glucosa por minuto y por mol de proteína, exhibiendo la mayor actividad a un pH comprendido entre 4.5 y 6.0 (figura 43).

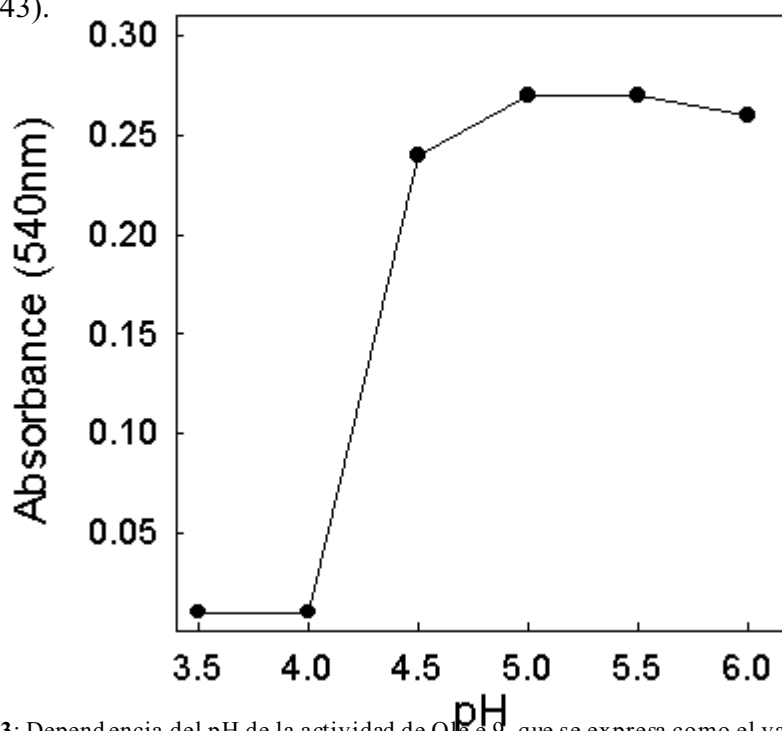


Figura 43: Dependencia del pH de la actividad de Ole e 9, que se expresa como el valor de absorción medido a 540 nm del producto coloreado obtenido por reacción de la glucosa liberada con el reactivo de cobre empleado en el ensayo (ver materiales y métodos).

Si se comparan las actividades de las α -1,3-glucanasas descritas es conveniente distinguir entre aquellas que son básicas y las que tienen un pI ácido. Las primeras tienen una actividad enzimática que puede ser entre 50 y 250 veces mayor que la de las segundas, presentando una actividad máxima a pH 4.5, y siendo el intervalo de pH al que son activas muy estrecho (entre 4.0 y 5.5). Son precisamente las α -1,3-glucanasas de la clase I las que parecen estar implicadas en los procesos de defensa, habiéndose demostrado la expresión de la proteína cuando se produce la infección por algún agente patógeno [Leubner-Metzger

y Meins, 1999]. Ole e 9 es una α -1,3-glucanasa ácida, lo que podría explicar la actividad específica baja comparada con, por ejemplo, una de las isoenzimas de las α -1,3-glucanasas de cebada Hv-GI (punto isoelectrico 8.6), cuya actividad específica es 1246 mg de glucosa liberados por minuto y por μ mol de enzima a un pH óptimo de 5.6 [Hoj y col., 1988]. En este sentido, cabe destacar el hecho de que existen muy pocas α -1,3-glucanasas bien caracterizadas a nivel enzimático, salvo las isoformas de la enzima de la cebada: Hv-GI y Hv-GII [Hoj y col., 1988; Chen y col., 1993; 1995]. Respecto al grupo de glucanasas “largas”, no se conoce ni la actividad específica de ninguna de ellas, ni de qué forma podría estar involucrada la extensión de su COOH-terminal en la ausencia de actividad. Teniendo en cuenta esta última incógnita y a diferencia de Ole e 9, no se ha detectado actividad en la enzima específica de anteras Bn-A6 [Hird y col., 1993]. Este hecho se ha explicado en base a la ausencia de uno de los Glu directamente implicados en la catálisis, concretamente el Glu-331 está sustituido por una Gln en esta α -1,3-glucanasa de colza [Chen y col., 1995]. Basándose en estos análisis, se podría descartar la participación del extremo COOH-terminal de las α -1,3-glucanasas “largas” en la unión al sustrato. Por otro lado, un hecho que apunta una explicación de este cambio, con una base fisiológica, es que estudios realizados con otra enzima específica de anteras de tabaco, Tag1, han demostrado que la expresión prematura, es decir, en estadíos tempranos de la maduración del polen, de la actividad α -glucanasa en las anteras de tabaco transgénico provoca la esterilidad de la planta [Worral y col., 1992], por lo que es posible que en la naturaleza, la actividad de Bn-A6 deba ser baja, o bien que pueda ser regulada por desamidación de dicho residuo catalítico [Chen y col., 1995]. En estudios previos se ha sugerido que la desamidación de proteínas actúan como relojes moleculares *in vivo* controlando el desarrollo y el envejecimiento [Robinson y Robinson, 1991]. Tanto Bn-A6 como Ole e 9 se encuentran en tejidos reproductores de la planta, la primera en anteras y la segunda en polen. Podría ocurrir que la actividad α -1,3-glucanasa tuviera que ser también baja en el polen disparándose, quizá, ante un cambio en las condiciones fisiológicas o ambientales de la planta, pudiendo, por tanto, formar parte de procesos del desarrollo o de defensa de la misma.

Según estos resultados, parece que con las enzimas de defensa α -1,3-glucanasas ocurre lo contrario que con las quitinasas, en las que un dominio extra sirve para destacar la actividad enzimática. Las quitinasas, enzimas de defensa, también se han clasificado en distintos grupos dependiendo de su punto isoelectrico y localización celular. Así las de la clase II son ácidas y presentan en su extremo NH₂-terminal un dominio de heveína que parece estar implicado en la unión al sustrato, incrementando la actividad catalítica de éstas con respecto a las quitinasas de la clase I que carecen de dicho dominio. En este sentido los autores Neuhaus y col [1996] han realizado recientemente una revisión. Podríamos estar ante un modo de regulación enzimática, positiva o negativa, en la que ésta depende de la

presencia en la molécula de extensiones polipeptídicas.

A la vista de los resultados obtenidos sobre Ole e 9, acerca de su capacidad para romper las uniones α -1,3 presentes en glucopolímeros, resulta interesante comparar su posible función biológica en la célula del polen y las funciones atribuidas al resto de los miembros de esta familia.

El crecimiento del tubo polínico se produce en un extremo del polen donde la organización citoplasmática de las células difiere del resto. En esta zona la pared celular es más fina y plástica que en el resto del polen. Sin embargo, durante el crecimiento del tubo polínico, la pared celular de éste no altera su grosor, lo que apunta que también debe producirse la síntesis de pared celular. Parece, por tanto que debe existir un balance entre rigidez y plasticidad en el extremo del tubo polínico controlado tanto por enzimas que sintetizan como por enzimas que degradan la pared celular. Hace bastantes años que Roggen y Stanley [1969] estudiaron el efecto de enzimas glucosidasas (α -1,3-glucanasa, α -1,4-glucanasa y peptidasa) durante la formación del tubo en el polen del peral. En estos estudios demostraron que, cuando se añade α -1,3-glucanasas al medio, al principio de la germinación del polen, se produce un incremento en la longitud del tubo polínico después de tres horas de crecimiento del mismo. Sin embargo, cuando la enzima era añadida después de una hora de crecimiento, no tenía ningún efecto sobre la longitud del tubo. Por lo tanto, la actividad α -1,3-glucanasa parece ser relevante en el comienzo de la germinación del polen disolviendo la pared de callosa presente en el poro que se produce en la intina en el lugar donde comienza a crecer el tubo polínico. El hecho de que la adición de la enzima no tuviese ningún efecto en el crecimiento del tubo, confirma que la callosa, sustrato natural de las enzimas glucanasas, no se encuentra en el extremo del mismo durante su crecimiento. En estos estudios también se demuestra que la relación en la concentración de glucanasas (α -1,3-glucanasas y α -1,4-glucanasas) es, también, un factor determinante en la iniciación de la extensión del tubo polínico.

No hay estudios posteriores sobre el papel de las glucanasas en el polen aunque sí se han detectado en tejidos implicados en la reproducción de las plantas, tales como el estilo y las anteras. Como ejemplo, tendríamos el papel de la α -1,3-glucanasa Tag1 durante la formación del polen en tabaco: en ese momento, la tetrada se encuentra rodeada de una pared de callosa y la degradación de esta pared por una α -1,3-glucanasas específica de anteras es un paso necesario para la liberación del polen fértil en el lóculo de la antera [Worrall y col., 1992; Bucciaglia y Smith, 1994]. En el estilo del tabaco se expresa, exclusivamente, la enzima Sp41. Su expresión se produce cuatro días antes de la antesis y alcanza el pico máximo dos días antes, y dura hasta el envejecimiento del estilo [Sessa y Fluhr, 1995]. Hasta el aislamiento y caracterización de Ole e 9, ninguna α -1,3-glucanasa había sido detectada en polen. Sin embargo, estas enzimas podrían tener un papel fisiológico importante en la formación o en el desarrollo del mismo, aunque tampoco hay que descartar que Ole e 9 pueda ejercer una función de defensa en el polen ya que se trata

de un tejido muy resistente frente al ataque de patógenos y a la degradación.

MODELIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE Ole e 9

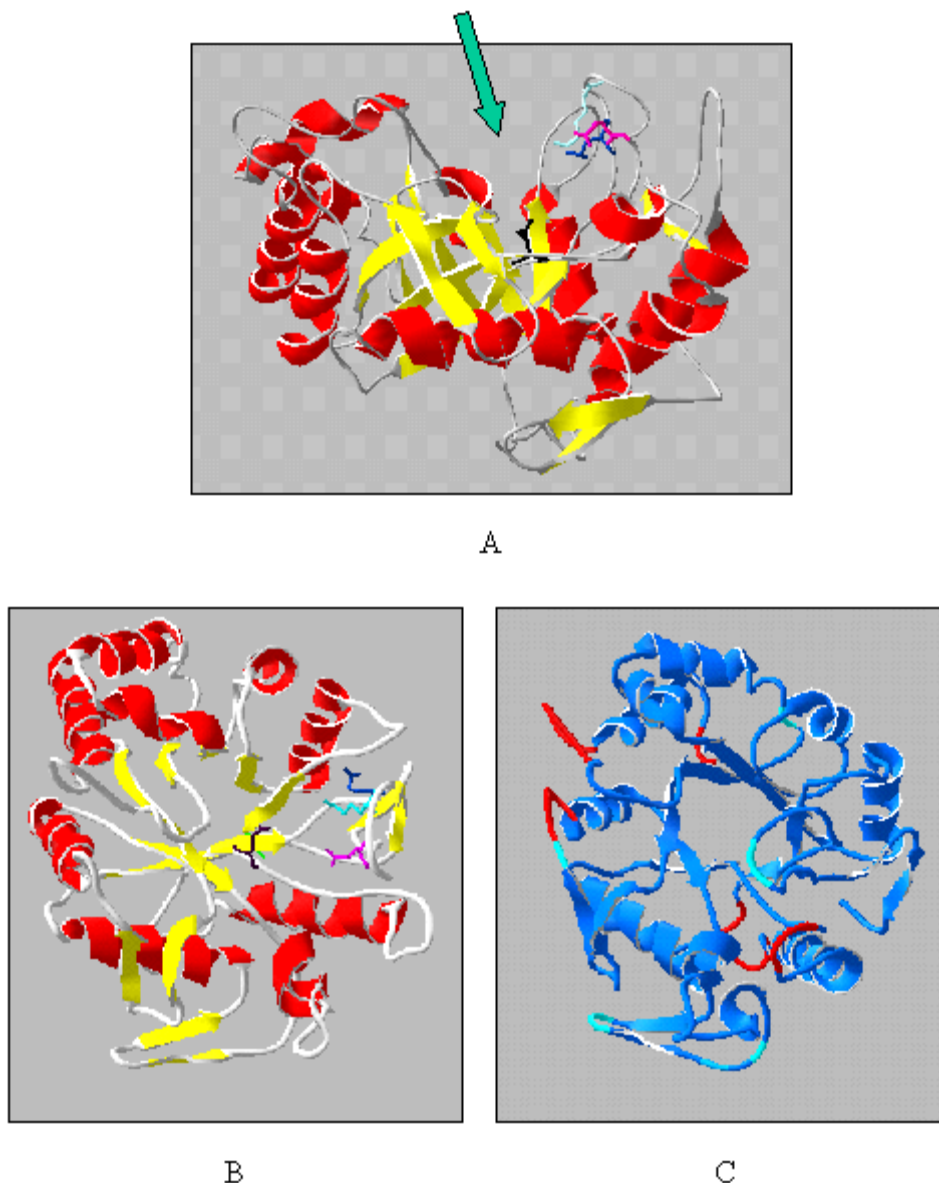


Figura 44: Modelo teórico de la estructura terciaria del alérgeno Ole e 9. A, visión lateral; B, visión frontal. En rojo se muestran los residuos dispuestos en hélice y en amarillo los dispuestos en lámina. Se muestran, también, las cadenas laterales de los cuatro residuos catalíticos: en negro el Glu-268, en azul oscuro el Glu-322, en azul claro la Lys-325 y en rosa el Glu-331. C, Visión frontal del alérgeno donde se muestran en color rojo y azul claro las regiones menos parecidas al modelo utilizado. Con la flecha se señala el sitio de unión al sustrato.

En la actualidad se conoce la estructura tridimensional de algunas proteínas de la familia de las glicosil-hidrolasas. Recientemente, Juers y col. [1999] han realizado una interesante revisión a este respecto. La disponibilidad de las coordenadas atómicas de estas proteínas y la homología existente entre todas las proteínas pertenecientes a esta familia, ha permitido realizar una primera aproximación teórica a la estructura terciaria de Ole e 9.

Para ello se utilizó el programa Swiss-Model Protein Modelling Server [Peitsch, 1996; Guex, y Peitsch, 1997]. La proteína sobre la cual el programa modeló fue la isoforma GII de la α -1,3-glucanasa del grano de la cebada (Hv-GII), de la que se ha obtenido mediante difracción de rayos X la estructura terciaria [Varghese y col., 1994]. Esta proteína, que presenta una similitud de estructura primaria con Ole e 9 del 41%, no contienen la región COOH-terminal del alergeno de olivo por lo que sólo se han podido modelizar los residuos comprendidos entre la Leu-4 y la Asn-352. En la figura 44 se recoge el modelo estructural teórico obtenido para Ole e 9.

La estructura tridimensional consiste en un motivo $(\alpha/\beta)_8$ (TIM-barrel) formado por una corona central compuesta por las ocho láminas β , conectadas con lazos, que pueden ser más o menos largos, a las ocho hélices α , que forman una corona externa. El surco que atraviesa la molécula, tienen una longitud de aproximadamente 40 Å y constituye el sitio de unión al sustrato donde se localizan los residuos catalíticos. El centro catalítico queda entre las hélices α_2 y α_3 del extremo NH₂-terminal de la cadena polipeptídica y entre las hélices α_5 y α_6 del extremo COOH-terminal de la cadena. En la figura 44A se puede comprobar que las diferencias entre ambas glucanasas se encuentran en los lazos de unión entre las hélices α y las láminas β , mientras que el plegamiento de la estructura secundaria periódica está muy conservada.

La estructura de una proteína puede ser descrita a diferentes niveles: estructura primaria, plegamiento, estructura del dominio y estructura de la superficie, siendo esta última la más relevante para la unión de anticuerpos, particularmente los epítomos, ya que es la zona de la superficie donde a nivel atómico el alergeno interacciona con el anticuerpo. Es por ello que en los procesos de reactividad cruzada tiene tanta importancia la similitud de los alérgenos a nivel de estructura terciaria, como a nivel de estructura primaria. El conocimiento de la estructura tridimensional de un alergeno, bien sea obtenida mediante técnicas como RMN o difracción de rayos X, o bien mediante la predicción empleando como molde una proteína homóloga cuyo plegamiento se conozca, resulta de gran interés para la determinación de los epítomos que pueden estar implicados en la unión a IgE, así como para el diseño de nuevas estrategias de estudio de la proteína.

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE Ole e 9

En el alergograma correspondiente al extracto de polen de olivo se había podido detectar un alergeno de masa molecular aproximada de 45 kDa que era reconocida con una alta prevalencia por los sueros de distintos pacientes alérgicos a polen de olivo. El aislamiento y la caracterización molecular de esta α -1,3-glucanasa permitió confirmar su naturaleza alérgica ya que la proteína purificada era reconocida en experimentos de inmunotransferencia por una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos que contenían

IgE específicas frente a componentes de alto peso molecular (figura 29). Con la misma mezcla de sueros se ha llevado a cabo un ensayo de titulación del alérgeno en ELISA para analizar la unión en fase soluble (figura 45), empleándose como control negativo el alérgeno Sin a 1 de mostaza.

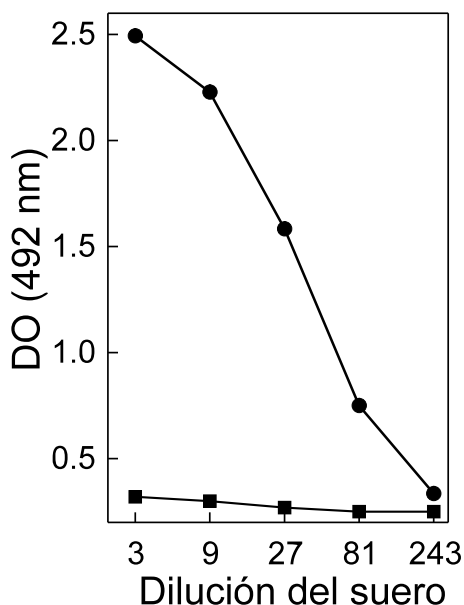


Figura 45: Análisis en ELISA de la unión de IgE a Ole e 9 purificado (●) con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a olivo. Se utilizó como control negativo Sin a 1 (■).

Para conocer la relevancia clínica de este nuevo alérgeno, quedaba por analizar la frecuencia de reconocimiento de Ole e 9 entre los pacientes alérgicos al polen de olivo. La selección de estos pacientes es crítica debido a que está demostrada la dependencia geográfica que existe en la frecuencia de reconocimiento de determinados alérgenos, como es el caso de Ole e 6 y Ole e 7, siendo uno de los factores más influyentes el nivel del polen en el ambiente. Por tanto, se emplearon sueros de pacientes de dos regiones españolas donde la exposición al polen de olivo es diferente: Jaén y Madrid.

De la región de Jaén se ensayaron mediante ELISA 46 sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. Los resultados se compararon con los obtenidos para Ole e 1 con esos mismos sueros. Como se observa en la figura 46A, el 65% reconocen a Ole e 9, mientras que el 75% reconocen a Ole e 1 (se consideraron positivos aquellos cuya unión condujese a una DO superior a 0.1). Cinco de los sueros que reconocían a Ole e 9 se emplearon para comparar, mediante ensayos de inmunotransferencia, la unión de IgE al alérgeno purificado y al extracto total del polen de olivo (figura 46B). En esta figura se puede observar el reconocimiento de varias proteínas del extracto del polen que presentan estos sueros, comparado con la única banda reactiva de Ole e 9 purificada.

De la región de Madrid se emplearon 92 sueros de pacientes resultando una frecuencia de reconocimiento del 52% (figura 47). Este valor es inferior que en el caso de los sueros procedentes de Jaén pero es superior al 50% que indica el umbral para considerar a un alérgeno como *principal*, según la nomenclatura clásica de King y col. [1994]. Este

dato indica que Ole e 9 puede ser considerado el segundo alérgeno más prevalente del polen de olivo, situándose inmediatamente detrás de Ole e 1.

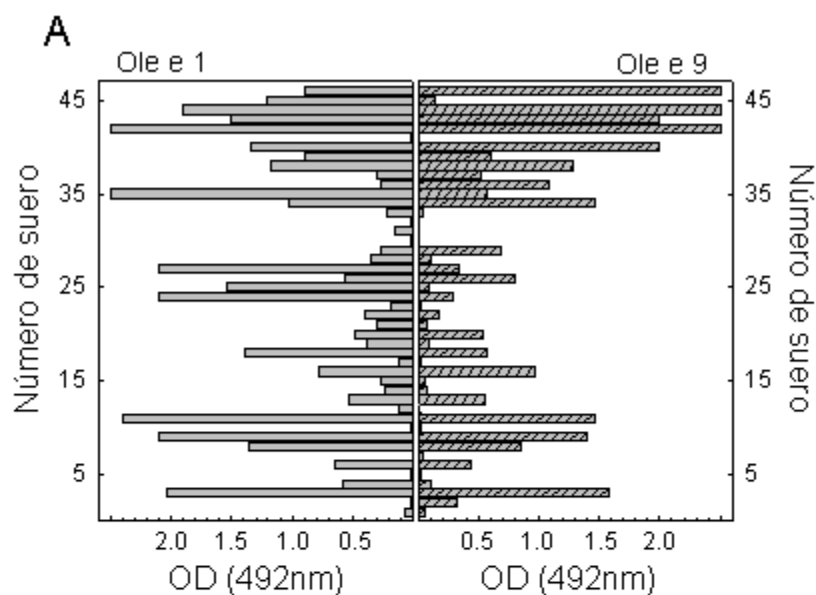


Figura 46: (A) ELISA de unión de las IgE de sueros de pacientes alérgicos a los alérgenos Ole e 1 y Ole e 9. (B) Inmunotinción del extracto de polen de olivo (40 µg de proteína total/pocillo), carril E, y de Ole e 9 purificada (0.8 µg/pocillo), carril P, con sueros de pacientes alérgicos de Jaén. El número de suero de la inmunodetección se corresponde con el del ELISA.

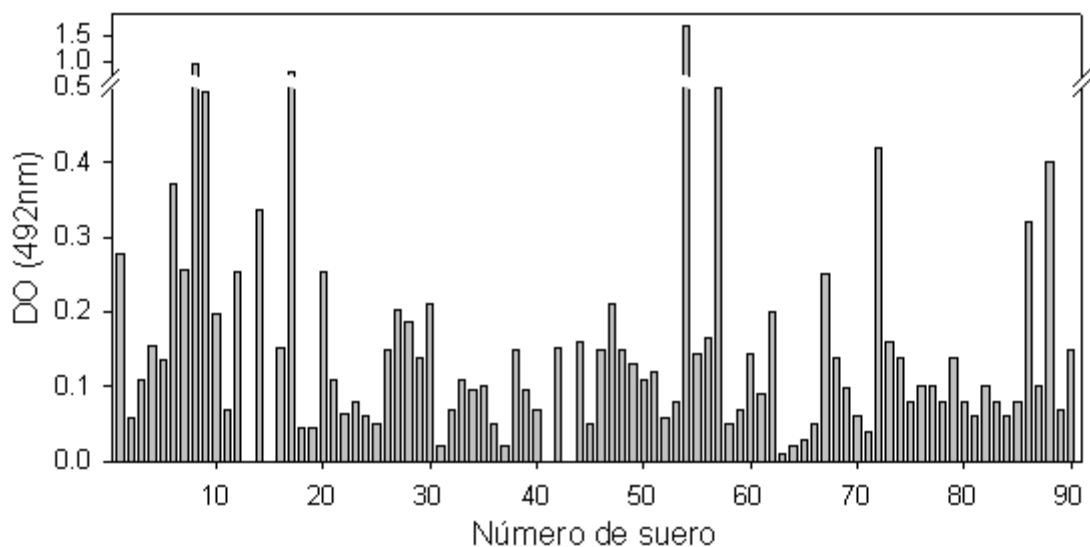


Figura 47: ELISA de unión a Ole e 9 de las IgE de sueros de pacientes alérgicos al olivo de la región de Madrid (se considera negativos aquellos con $DO < 0.1$).

Aunque Ole e 9 es un alérgeno con alta prevalencia tanto en Jaén como en Madrid, si comparamos la intensidad de la respuesta en ELISA de los sueros de las dos poblaciones, (figura 48), se puede observar que los pacientes de Jaén poseen un nivel más alto de IgEs específicas de Ole e 9 que los pacientes de Madrid.

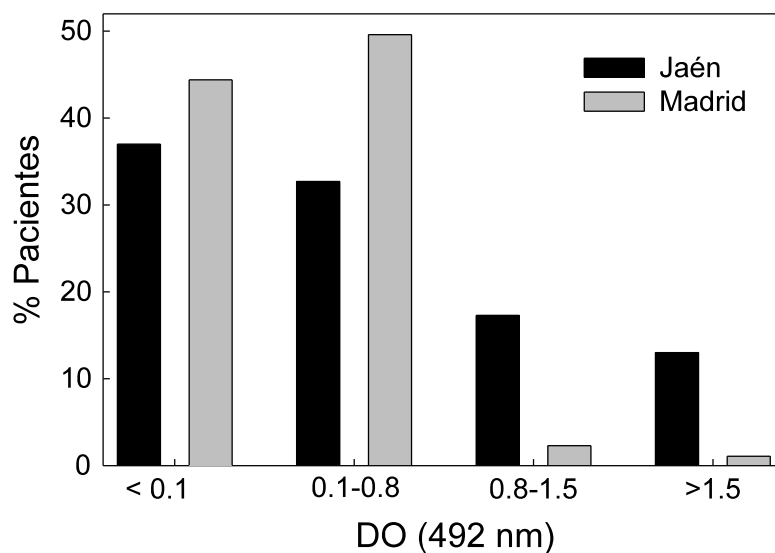


Figura 48: Análisis mediante ELSA de la distribución de la intensidad de respuesta a Ole e 9 de IgE de pacientes sensibilizados al polen de olivo de las dos poblaciones seleccionadas.

En estudios previos ya se había apuntado hacia la existencia de diferencias notables en la prevalencia de los alérgenos más importantes del polen de olivo, según la región en la que habita el paciente alérgico [Rodríguez y col., 1998]. Así, mientras en regiones como Madrid y Valencia, donde los pacientes están expuestos a bajos niveles de polen de olivo,

predomina el reconocimiento al alérgeno Ole e 1, en provincias como Jaén en la que la población está expuesta a altos niveles de polen de olivo, muchos sueros reconocen complejos patrones de bandas de alto y bajo peso molecular, además de Ole e 1. En el caso de Ole e 9, la mayor diferencia entre las dos regiones no es la prevalencia sino el grado de sensibilización de los pacientes, pudiendo ser esta diferencia atribuida a los niveles en los que se encuentra este alérgeno en el polen de olivo, mucho menores que los de Ole e 1 (el análisis del extracto del polen de olivo mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie muestra que Ole e 1 es la proteína más abundante en esta fuente biológica). Esto explicaría, por ejemplo, que sólo en aquellas regiones donde los niveles de polen de olivo en la época de floración sean muy elevados, Ole e 9 podrá producir una mayor sensibilización en los pacientes alérgicos y estimular la producción de una considerable cantidad de IgE específica (figura 48).

La dependencia del factor geográfico en la prevalencia a algunos alérgenos podría tener una gran importancia a la hora de realizar un diagnóstico y de diseñar una estrategia de inmunoterapia para cada paciente alérgico, pues tratamientos de inmunización frente a polen de olivo que pueden resultar eficaces con pacientes de una determinada área pueden tener una respuesta limitada en pacientes de otras regiones.

Localización de regiones inmunodominantes en Ole e 9

La fragmentación proteolítica de una proteína alérgica, bien sea química o enzimática, es una estrategia alternativa a la obtención de péptidos sintéticos o péptidos recombinantes para su mapeo epitópico [Mazzoni y col., 1996]. Para realizar una aproximación preliminar al mapeo epitópico de Ole e 9, y determinar alguna región inmunodominante, se emplearon los péptidos resultantes de la digestión proteolítica del alérgeno con tripsina (figura 34) después de su purificación mediante HPLC. Alícuotas idénticas de cada uno de los péptidos obtenidos (P0, P1, P2, P3, P4 y P5) (tabla 17) se aplicaron en una membrana de nitrocelulosa y se realizó la detección inmunológica con una mezcla de sueros, así como con tres sueros individuales que reconocen la proteína. En la figura 49 se muestra el resultado obtenido con la mezcla de sueros, que fue idéntico al obtenido con los sueros individuales. Podemos observar que sólo P5, que está localizado en la extensión del COOH-terminal de la cadena polipeptídica, es capaz de unir IgE, indicando que contiene una región inmunodominante en Ole e 9. Sin embargo, no se debe descartar la existencia de otros determinantes antigénicos localizados en otras zonas de la molécula ya que existen muchas regiones aún sin explorar. Además, determinados epítomos pueden estar incompletos o pueden poseer un carácter discontinuo lo que impediría su reconocimiento en la membrana. Por otro lado, el hallazgo de un epítomo en P5 es congruente con el hecho de que la región COOH-terminal, que no tienen estructura

periódica y es significativamente hidrofílica (figura 41), se encuentre expuesta en la superficie de la molécula, y por tanto, fácilmente accesible a los anticuerpos. Este estudio es aún muy preliminar, y el análisis inmunológico completo de Ole e 9 precisa aún mucha investigación.

Tabla 17: Secuencia completa de los péptidos tripticos de Ole e 9. Se indica su secuencia de aminoácidos y la posición que ocupan en la molécula.

Péptido	Secuencia	Posición
P0	NTQNPTTPATPTPTPK	352-367
P1	AYVGNLINHLK	289-299
P2	DIEIVVAETGWPHGGDSNEVGPSLDNAK	261-288
P3	VSTVHAMAVLSQSYPPSSGVFNPLGDTMK	158-187
P4a	SIDTYLFSLYDEDK	311-324
P4b	YFGLFKPDGSTTYDVGLLK	333-351
P5	AAGSWCVKPGVSDDQLTGNINYACSQGIDCGPIQPGGACFEPNTVK	368-414

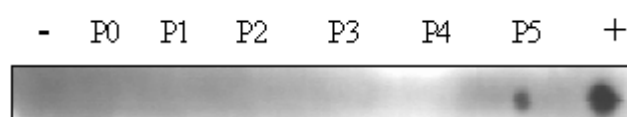


Figura 49: Reconocimiento de los péptidos tripticos de Ole e 9 por una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos a olivo. Como control positivo se empleó Ole e 9 purificada (+) y como control negativo albúmina (-).

Presencia de proteínas homólogas a Ole e 9 en otros pólenes

Ensayos de inhibición

Se ha llevado a cabo un ELISA de inhibición de la unión de IgE a Ole e 9 unido en fase sólida. Para ello se empleó una mezcla de sueros de pacientes alérgicos y como inhibidor extractos de diferentes fuentes biológicas: pólenes y frutas como el melocotón (figura 50). La preincubación de los sueros con los extractos inhibe moderadamente la unión de IgE a Ole e 9 y sólo cuando se utiliza como inhibidor el extracto de olivo se consigue bloquear el 98% de la unión. En contra de lo que se podría esperar, ni tan siquiera los miembros de la familia de las oleáceas, *Ligustrum*, *Syringa* y *Fraxinus*, son capaces de mostrar una notable inhibición. Aunque existen diferencias entre estos extractos, siendo el de *Ligustrum* el que presenta la máxima potencia inhibitoria, nunca se alcanzaron valores de inhibición superiores al 30%. En especies filogenéticamente más alejadas la situación

es parecida, salvo en el caso de *Chenopodium album*, que inhibe en un 52% la unión de IgE a Ole e 9. Estos resultados se pueden explicar por el hecho de que las α -1,3-glucanasas de distintas especies no posean secuencias de aminoácidos muy conservadas, lo que conduciría a no compartir un gran número de epítomos. También puede ocurrir que la cantidad en que se encuentre la proteína homóloga en otras especies sea menor que en el polen de olivo. En este sentido, Ole e 9 difiere de otros alérgenos del olivo como Ole e 2 (profilina del olivo, considerada un panalérgeno) [Ledesma y col., 1998] y Ole e 3 [Batanero y col., 1996; Ledesma y col., 1998], ya que éstos han sido descritos como alérgenos implicados en la reactividad cruzada entre pólenes de diferentes especies.

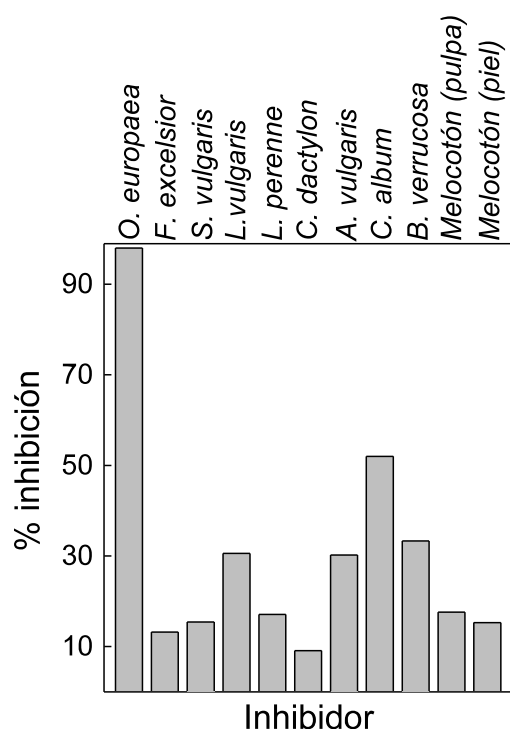


Figura 50: Análisis de la presencia de alérgenos homólogos de Ole e 9 en diversos extractos vegetales mediante ensayo de inhibición en ELISA de la unión de IgE de una mezcla de cinco sueros sensibles a Ole e 9 a dicho alérgeno previamente adsorbido a poliestireno, utilizando como inhibidores extractos de pólenes (500 μ g, determinado por Lowry) de: *O. europaea* (Biopol), *F. excelsior*, *S. vulgaris*, *L. vulgare*, *L. perenne*, *C. dactylon*, *A. vulgaris*, *C. album*, *B. verrucosa*, y pulpa y piel de melocotón.

Análisis por inmunotransferencia

Con el fin de poder identificar posibles componentes de alto peso molecular presentes en otras fuentes biológicas que tengan alguna relación inmunológica con alérgenos del polen de olivo, se llevó a cabo la inmunodetección de las proteínas de los extractos previamente ensayados en ELISA electroforetizados en PAGE-SDS y transferidos a membranas. Para realizar este ensayo, se empleó una mezcla de sueros de pacientes

alérgicos a olivo, que además eran reactivos a Ole e 9. El resultado electroforético tras la tinción con azul de Coomassie se muestra en la figura 51A, donde llama la atención la aparente diferencia en cuanto a la cantidad proteica aplicada de cada extracto de las distintas oleáceas. Estas diferencias serían atribuibles al hecho de que la determinación de la cantidad de proteína aplicada se ha realizado mediante un ensayo de Lowry, el cual puede verse afectado por la presencia de pigmentos como ocurre con el extracto de *F. excelsior*. En la figura 51B, se observa que los sueros de pacientes alérgicos a olivo reconocen componentes alérgénicos a 18-20 kDa (en las oleáceas, se trata del correspondiente homólogo de Ole e 1), 35-36 kDa, en gramíneas y abedul, y a 40-48 kDa y 66 kDa en todos los extractos de pólenes ensayados.

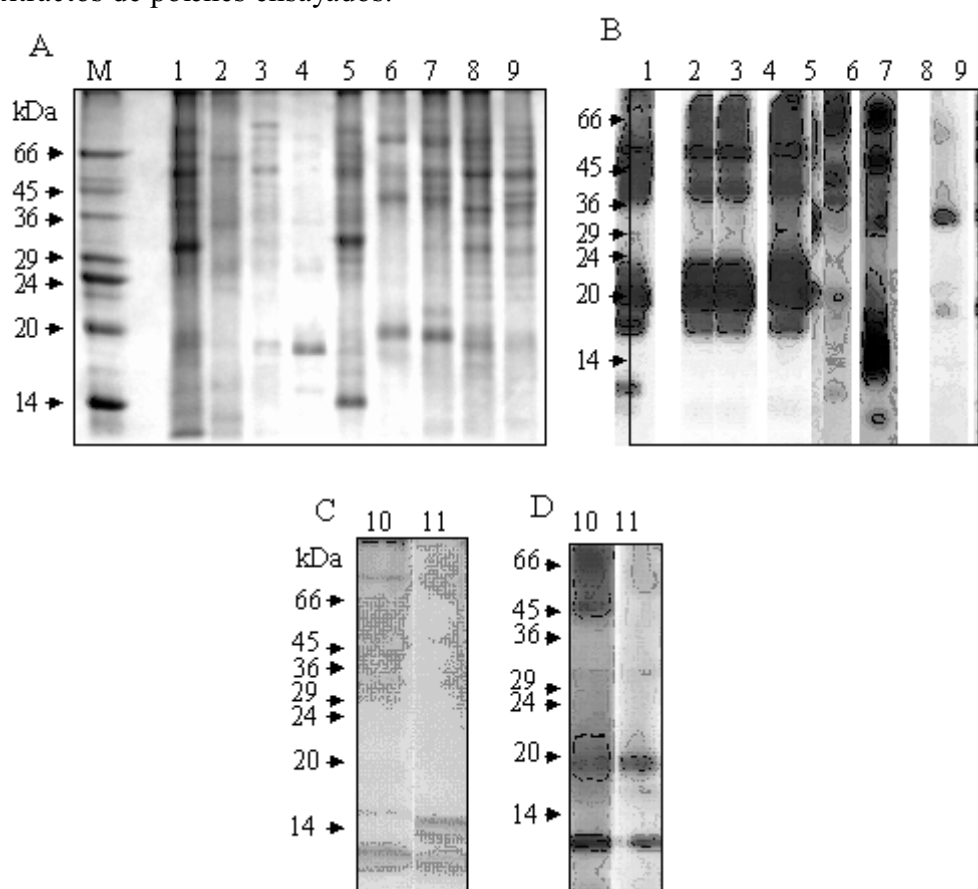


Figura 51: Análisis en inmunotransferencia de la reactividad de diversos extractos vegetales frente a sueros de pacientes alérgicos a olivo. (A) y (C) PAGE-SDS de los distintos extractos teñidos con azul de Coomassie; (B) y (D) inmunodetección de los mismos extractos con la mezcla de cinco sueros empleada en los experimentos de la figura 50. La cantidad de proteína total aplicada por pocillo fue 50 µg (estimado por Lowry). Extractos de polen de: (1) *O. europaea* (Biopol), (2) *F. Excelsior*, (3) *S. vulgaris*, (4) *L. Vulgare*, (5) *L. perenne*, (6) *B. verrucosa*, (7) *C. album*, (8) *A. vulgaris*, (9) *C. dactylon*, y pulpa (10) y piel (11) de melocotón.

En el extracto de melocotón, se pueden observar unas proteínas de masa molecular

aparente de 9-10 kDa que probablemente sean las LTPs que se expresan principalmente en la piel del melocotón donde ejercen un papel de defensa, además se detecta otra banda de 18-20 kDa. En el caso de la pulpa de este fruto se detecta, además, una banda de 46 kDa (figura 51C y D).

Estos resultados indican la existencia de alérgenos de alto peso molecular presentes en estas fuentes biológicas que pueden tener alguna relación inmunológica con alérgenos del polen de olivo.

Análisis por Northern blot

El Northern blot es una técnica alternativa que permite detectar la expresión de una proteína a nivel de su mRNA por lo que la presencia de proteínas homólogas de una dada pueden explorarse, también, mediante esta técnica. El ensayo se realizó, además de con RNA aislado del polen de *Olea europaea*, con el de pólenes de las especies *Syringa vulgaris*, *Ligustrum vulgare*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne*, *Fraxinus excelsior*, *Artemisia vulgaris*, *Betula verrucosa* y *Salsola kali*. Como control positivo se empleó polen de olivo. Las muestras de RNA, tras ser fraccionadas en un gel de agarosa al 1.2% con formaldehído y transferidas a membranas de nylon, se hibridaron con una sonda marcada radiactivamente con ^{-32}P -dCTP, que consistía en un fragmento de cDNA de 700 pb obtenido mediante amplificación por PCR con los cebadores OL9B y OL9C, como se describe en el apartado del clonaje de Ole e 9.

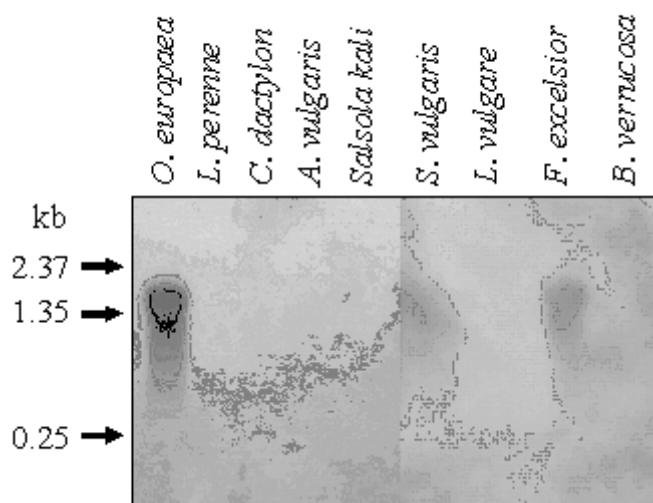


Figura 52: Análisis mediante Northern blot del RNA total de los pólenes de (1) *O. europaea*, (2) *L. perenne*, (3) *C. dactylon*, (4) *A. vulgaris*, (5) *S. kali*, (6) *S. vulgaris*, (7) *L. vulgare*, (8) *F. excelsior* y (9) *B. verrucosa*. Los números corresponden a los marcadores de RNA utilizados como patrones, indicándose su tamaño en kb.

En el polen de olivo se detectó un único transcrito de 1580 pb, y tan sólo se observó la presencia de niveles considerables de mRNA en algunos de los pólenes de oleáceas, siendo la señal de mayor intensidad en el polen de *F. excelsior*. Mucho menor fue la señal

de *L. vulgare*, y negativa en *S. vulgaris* y en los pólenes no relacionados filogenéticamente con el olivo (figura 52). Estos resultados sugieren que, en el caso de que existan α -1,3-glucanasas largas y ácidas en los pólenes ensayados, el grado de conservación de estas moléculas a nivel de la secuencia de nucleótidos es bajo.

Estos estudios de búsqueda de proteínas homólogas a Ole e 9 en otras especies vegetales se encuentran en fase muy preliminar. Para sacar conclusiones definitivas, estos estudios habrá que realizarlos con un mayor número de extractos, principalmente, de frutas y verduras, por dos razones. Una es que estas enzimas, que presentan una estructura tridimensional muy conservada, deben cumplir una función biológica importante en las plantas ya que se encuentran ampliamente distribuidas en las mismas, habiendo sido relacionadas, entre otros procesos, con el de la maduración del fruto. Estudios realizados por Hinton y Pressey [1980] demostraban la existencia de actividad α -1,3-glucanasa durante el proceso de maduración del fruto en melocotón y en tomate y, recientemente, se ha aislado de la pulpa del plátano una α -1,3-glucanasa en gran cantidad [Peumans y col., 2000]. Sin embargo, todavía no se ha estudiado su alergenicidad. La segunda razón es que Hev b 2, α -1,3-glucanasa de látex y alérgeno principal de esta fuente, ha sido relacionado con la reactividad cruzada entre frutas y látex [Yagami y col., 1998], ya que es reconocido por los sueros de pacientes alérgicos a tomate, patatas y plátano, por lo que, además, ha sido asociado con el llamado “síndrome látex-frutas”. Por otro lado, el hecho de que las α -1,3-glucanasas se encuentren ampliamente distribuidas en plantas podría convertirlas en un nuevo panalergeno capaz de inducir reactividad cruzada entre vegetales [Yagami y col., 1998]. Con el descubrimiento de Ole e 9, única α -1,3-glucanasa con carácter alérgico descrita en polen, la panalergenicidad de esta familia de proteínas podría hacerse extensible a pólenes, pudiendo contribuir a explicar la reactividad cruzada que se ha encontrado entre pólenes y frutas.

La existencia de alérgenos con un amplio espectro de distribución no es un concepto nuevo. Las profilinas se han descrito como responsables de la reactividad cruzada entre pólenes y una gran variedad de alimentos de origen vegetal [Calkhoven y col., 1988; Vallier y col., 1992]. Más recientemente, se han considerado como panalergenos presentes en numerosas frutas las LTP [Pastorello y col., 1994; Sánchez-Monge y col., 1999], las quitinasas, que también han sido relacionadas con el “síndrome látex-frutas” [Blanco y col., 1999; Díaz-Perales y col., 1999; Sánchez-Monge y col., 2000], y otras proteínas relacionadas con la defensa de las plantas [Breiteneder y Ebner, 2000]. Se plantea, por ello, la cuestión ¿qué tienen las proteínas de defensa en común?. Todas ellas tienen un tamaño pequeño, entre 5 y 70 kDa, son solubles, estables y resistentes a la proteólisis, características todas ellas fundamentales para que una proteína sea un alérgeno. En este sentido, cabe hacer una llamada de atención sobre las complicaciones que pueden surgir

como consecuencia de la modificación genética de las plantas con el fin de mejorar la resistencia de éstas al ataque de plagas de insectos, hongos y otros agentes invasivos, ya que la inserción de nuevos genes o el aumento en los niveles de expresión de aquellos que codifiquen proteínas de defensa podría conducir a un aumento en el potencial alergénico de esas plantas.

ESPECIFICIDAD DE TEJIDO DEL mRNA DE Ole e 9

Se ha analizado la expresión del mRNA de Ole e 9, en diversos tejidos del árbol del olivo, mediante hibridación de los RNA aislados de polen, tallo, hoja y fruto. Estas muestras tras ser fraccionadas en un gel de agarosa al 1.2% con formaldehído y transferidas a membranas de nylon, se hibridaron con la misma sonda utilizada para el experimento anterior marcada radiactivamente con ^{-32}P -dCTP. Un único transcrito de 1580 pb se detectó en polen (figura 53). Ninguna señal fue observada en los restantes tejidos del olivo, lo que sugiere que el gen que codifica el alergeno Ole e 9 se expresa exclusivamente en polen. Ninguno de los alérgenos del polen de olivo descritos hasta la fecha ha sido localizado en otro tejido distinto, esto podría explicar la ausencia de hipersensibilidad de los pacientes alérgicos al polen cuando ingieren aceitunas o aceite de oliva.

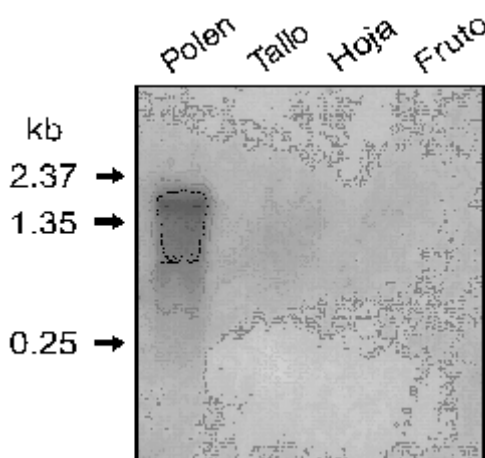


Figura 53: Análisis por Northern blot del RNA de tejidos de olivo. Se aplicaron 10 μg de RNA total por pocillo. Los números corresponden a los marcadores de RNA utilizados como patrones, indicándose su tamaño en kb.

Las α -1,3-glucanasas son enzimas que varían en su localización tisular. Así las enzimas de la clase I (cortas y pI básico) se acumulan, principalmente en raíces y en hojas [Felix y col., 1986; Shinshi y col., 1987; Neale y col., 1900], de forma que su acumulación en las hojas de la parte superior de la planta es menor que en las de la parte inferior y

parecen tener un fuerte efecto antifúngico [Vögeli y col., 1994; van de Rhee y col., 1993]. Las α -1,3-glucanasas de la clase II y III (cortas y pI ácido) se localizan de forma constitutiva en flores y semillas pero no en hojas y raíces [Hennin y col., 1993], aunque se puede inducir la expresión de sus genes en estos tejidos en respuesta al ataque de patógenos. Por otro lado, se han descrito glucanasas que se expresan específicamente en tejidos reproductores como Tag1 y Sp41 de anteras y estilo, respectivamente, del tabaco [Bucciaglia y Smith, 1994; Lotan y col., 1989] y que no parecen estar relacionadas con los procesos de defensa de las plantas. Las enzimas de *B. napus* (Bn-A6) y *A. thaliana* (At-A6) son específicas de anteras y se han implicado en el proceso de germinación del polen, al correlacionarse su expresión durante la degradación de la callosa que forma la pared de la tetraedra [Hird y col., 1993]. Finalmente, encontramos la enzima de *S. gilgiana* (Sg-GN1) específica de células del amento de flores masculinas [Futamura y col., 2000], que aunque no está descrita su localización exacta dentro de la flor, parece que se pudiese expresar en anteras. En general, la localización tisular de las distintas clases de α -1,3-glucanasas es muy compleja, así como su patrón de regulación ya que, además, difiere entre las distintas especies. Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha ninguna α -1,3-glucanasa específica de polen, lo que convertiría a Ole e 9 en la primera descrita en este tejido donde podría ejercer un papel importante en la formación del polen o en el desarrollo del tubo polínico, aunque tampoco habría que descartar una posible actuación de defensa frente a agresiones externas.

EXPRESIÓN DEL ALERGENO Ole e 9 EN *PICHA PASTORIS*

Ya se ha comentado en la introducción de esta memoria las ventajas que supone la utilización de los alergen recombinantes, no sólo por el hecho de que la cantidad obtenida es mayor que la que se puede aislar de la fuente natural, sino por la posibilidad que ofrece esta tecnología de manipular y alterar las propiedades de las proteínas. De manera particular, en el diagnóstico y en el tratamiento de la alergia parece cada vez más necesario la utilización de estas moléculas alergénicas recombinantes, bien caracterizadas y con propiedades equivalentes a las de los alergen naturales debido a la dificultad que supone obtener preparaciones homogéneas de alergen a partir de sus fuentes naturales. Por tanto, el primer objetivo después de la clonación y secuenciación de Ole e 9, es introducir el gen en un sistema de expresión apropiado con el fin de obtener una forma recombinante del alergen que sea biológicamente activa. Se ha escogido el sistema de expresión de *P. pastoris* porque la expresión de proteínas que presentan puentes disulfuro y están glicosiladas, como Ole e 1, había proporcionado moléculas activas biológica e inmunológicamente. Además, aunque Ole e 1 y Ole e 9 comparten algunas características moleculares como son la glicosilación y la presencia de puentes disulfuro, tienen diferencias significativas como son el tamaño y la actividad biológica lo que permitiría validar y ampliar las posibilidades de utilización de este sistema de expresión tanto para alergen del polen de olivo como de otras fuentes naturales.

Clonaje y expresión de Ole e 9

Para la expresión de Ole e 9 se escogieron los clones 48 y 12, ambos tienen la misma estructura primaria, pero el primero posee la secuencia de la preproteína con el péptido señal y el segundo contiene la proteína madura (figura 39). Para la amplificación por PCR del clon 48 se habían empleado los cebadores NTC-OL9 y CT-OL9, que llevaban los sitios de restricción *Xho*I y *Not*I, respectivamente. El clon 12 había sido amplificado con los cebadores NT-OL9 y CT-OL9, el primero no sólo incluye el sitio *Xho* I, sino también parte de la secuencia del prepro péptido factor , que conduce a las proteínas sintetizadas en *P. pastoris* hacia la ruta de secreción. Los dos clones estaban clonados en el vector pCR 2.1. La expresión simultánea de ambos clones permitiría comprobar si la secuencia del péptido señal de Ole e 9 era o no reconocida por peptidasas específicas de *P. pastoris* como ocurre en algunas proteínas de origen vegetal o procedentes de hongos [Martínez-Ruiz y col., 1997]. En caso de que fuera procesada, podría, también, comprobarse si ello ocurriría por el mismo sitio que la forma natural en el polen. Para ello fue necesario utilizar dos vectores de expresión distintos: pPICZ A para el clon 12, que incluye la secuencia prepro péptido factor que permite la fusión de la región codificante de la proteína a

continuación de dicha secuencia, y pPICZA para el clon 48, que no incluye la secuencia de secreción endógena.

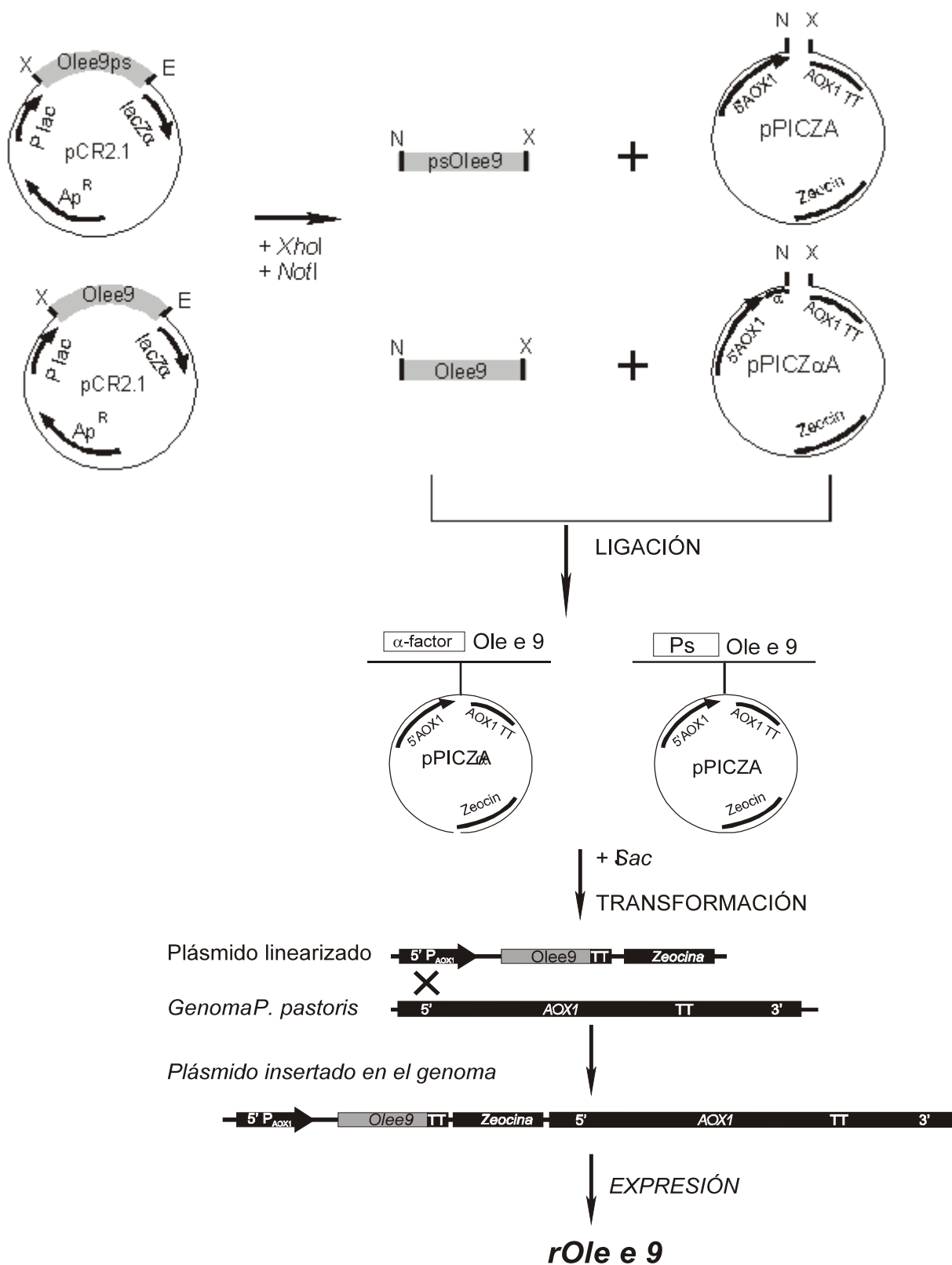


Figura 54: Estrategia de clonaje de *Ole e 9* en los vectores de expresión pPICZA y pPICZ α .

La construcción de los plásmidos recombinantes pPICZ A/Olee9 y pPICZA/psOlee9 se realizó insertando el fragmento de DNA resultante de la digestión de las construcciones pCR 2.1/OLE12 y pCR 2.1/OLE48, respectivamente, con las enzimas *XhoI* y *NotI* en los mismos sitios de los plásmidos pPICZ A y pPICZA de forma que el gen de Ole e 9 queda situado a continuación del promotor AOX1, inducible por metanol (figura 54). Para poder introducir estas construcciones en el genoma de la levadura se linearizaron digiriendo con la enzima de restricción *SacI*, y se emplearon para transformar células de *P. pastoris* X-33 utilizando el método que hace uso de polietilenglicol.

Todas las células transformantes obtenidas mostraron un fenotipo Mut⁺, como cabría esperar tras la inserción del plásmido linearizado en el genoma de la levadura, según se muestra en la figura 54. Entre ellas se escogieron cinco de cada construcción para ser inducidas con metanol siguiendo el mismo protocolo que se había empleado para las cepas Mut^s de Ole e 1, y testar los niveles de producción de proteína. Se tomaron muestras del medio extracelular del cultivo a distintos tiempos y se analizó el nivel de expresión, no detectándose ninguna banda proteica del tamaño esperado ni con tinción con azul de Coomassie ni con plata para ninguna de las dos construcciones. Para comprobar si el problema radicaba en la baja producción y de ahí su detección negativa mediante tinción con azul de Coomassie, las alícuotas de las diez colonias recogidas a las 96 horas de inducción fueron sometidas a una electroforesis en PAGE-SDS y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa para realizar una inmunotinción con una mezcla de cinco sueros positivos a nOle e 9. En el caso de las colonias transformadas con la construcción pPICZA/psOlee9 no se detectó expresión de proteína en el medio extracelular, lo parecía ser debido a que *P. pastoris* no reconociese el péptido señal de Ole e 9 y no fuese secretada al medio. Aunque las secuencias señal tienen una serie de características comunes a todos los organismos eucariotas, no son necesariamente intercambiables [von Heijne y Abrahamsén, 1989]. Se han descrito ejemplos de secreción en *P. pastoris* usando la propia secuencia señal de la proteína heteróloga [Martínez-Ruiz y col., 1997], pero también existen otros casos en los que no se ha conseguido secretar el producto si no se usa una secuencia señal ya probada en *P. pastoris*. En el caso de la construcción, pPICZ A/Olee9, lo que parecía haber ocurrido era que la proteína se había degradado ya que se detectaban bandas de bajo peso molecular que no se encontraba en los controles negativos (células transformadas con el plásmido sin inserto e inducidas siguiendo el mismo protocolo). Este hecho se confirmó transfiriendo alícuotas del medio a las 24 y 48 h de inducción, que fueron teñidas con la misma mezcla de sueros. Como se observa en la figura 55, a las 24 h se detecta expresión de una proteína de masa molecular aparente de 47 kDa capaz de unir IgE, pero esta proteína es degradada casi totalmente a las 48 h.

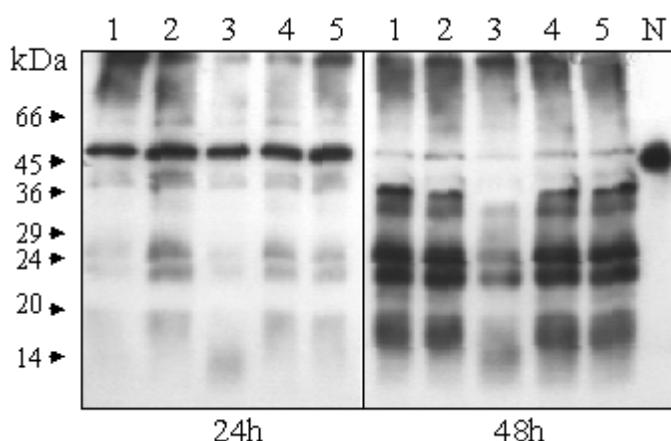


Figura 55: Expresión de rOle e 9 en cinco colonias (1-5) transformadas a las 24 y 48 h de inducción. Los números marcan los patrones de masa molecular.

Para intentar mejorar la producción del alérgeno, se escogió una de las colonias previamente testadas y se realizó la inducción con metanol sin llevar a cabo el paso previo de la concentración cuando las células pasan del medio de crecimiento (BMGY) al medio de inducción (inducción de cepas Mut⁺ en materiales y métodos). Así, se testó la producción de proteína empleando tres medios distintos (BMMY, BMMH y MMH). BMMH es un medio mínimo tamponado, que facilita la purificación de las proteínas expresadas al carecer de determinadas proteínas y pigmentos que aportan la peptona y el extracto de levadura, y MMH es un medio no tamponado, con su utilización se pretendía evitar que actuaran las proteasas activas a pH neutro. Se emplearon también estos medios añadiendo 1% de casaminoácidos para inhibir proteasas extracelulares, pero los resultados fueron idénticos con y sin casaminoácidos. Se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos (0, 6, 24, 32 y 48 h) y se analizó el nivel de expresión (figura 56A). Aunque, en todos los casos, tras 6 h de inducción ya se puede observar una banda en PAGE-SDS con una masa molecular aparente de 47 kDa, la máxima producción se consigue a las 48 h. Para confirmar que la proteína expresada era Ole e 9, se transfirieron las muestras a membranas de nitrocelulosa y se tiñeron con una mezcla de cinco sueros reactivos frente a nOle e 9, dando, así mismo, una reacción positiva. En todos los casos seguía habiendo algo de degradación de la proteína, observándose un fragmento que muestra reacción positiva con los sueros. Puesto que la degradación aumenta con el tiempo, en la producción de esta proteína es muy importante la selección del tiempo de inducción adecuado, que no debe ser superior a las 48 h. Finalmente se seleccionó el medio BMMH para la producción a gran escala del alérgeno.

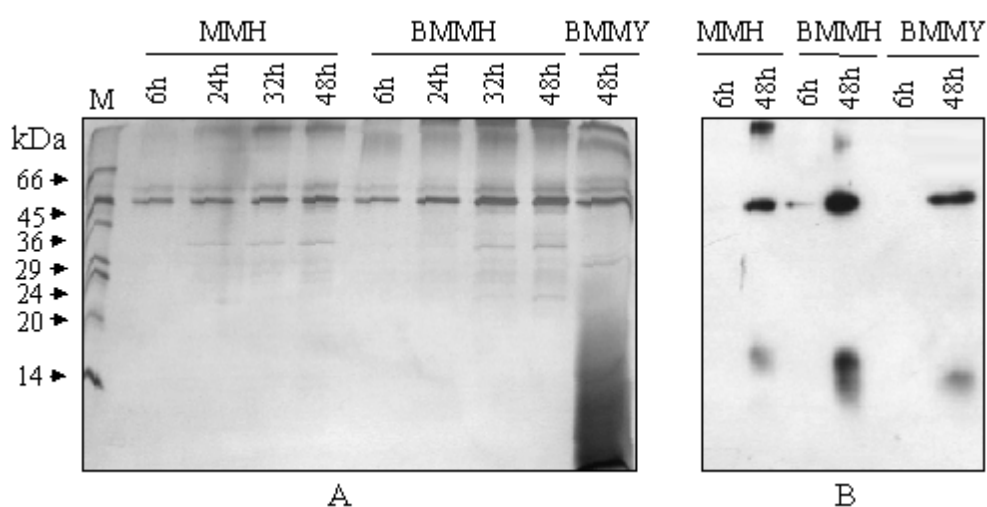


Figura 56: Expresión de rOle e 9 a distintos tiempos de inducción del cultivo empleando tres medios de cultivo distintos (MMH, BMMH y BMMY), analizados mediante la tinción con plata (A) y con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos (B).

Aislamiento del alérgeno recombinante, rOle e 9

La purificación de rOle e 9 se llevó a cabo a partir del sobrenadante del cultivo celular dializado, mediante una sola etapa cromatográfica utilizando un intercambio iónico en DEAE- celulosa y eluyéndose la proteína con un gradiente en bicarbonato amónico pH 8.0. En la figura 57A se muestra el perfil de elución de esta cromatografía registrado a 280 nm. El alérgeno recombinante eluye a una fuerza iónica entre 0.12-0.15 M. Un análisis del grado de pureza del alérgeno obtenido se recoge en la figura 57B. Los intentos para mejorar la purificación del alérgeno recombinante empleando cromatografías de penetrabilidad, resultaron infructuosos, puesto que cuando se aumentaba la concentración de proteína, rOle e 9 tendía a precipitar, e incluso, se producía su desnaturalización: el análisis posterior mediante PAGE-SDS en condiciones no reductoras rendía el dímero de rOle e 9.

El rendimiento de la producción es de 2 mg del alérgeno recombinante puro, por litro de cultivo celular. El rendimiento es mucho menor que el obtenido en la producción de rOle e 1 y mOle e 1, pero comparable con el rendimiento obtenido en la producción de otros alérgenos en este mismo sistema, como puede ser Cyn d 1 (1.5 mg/L de cultivo)[Smith y col., 1996].

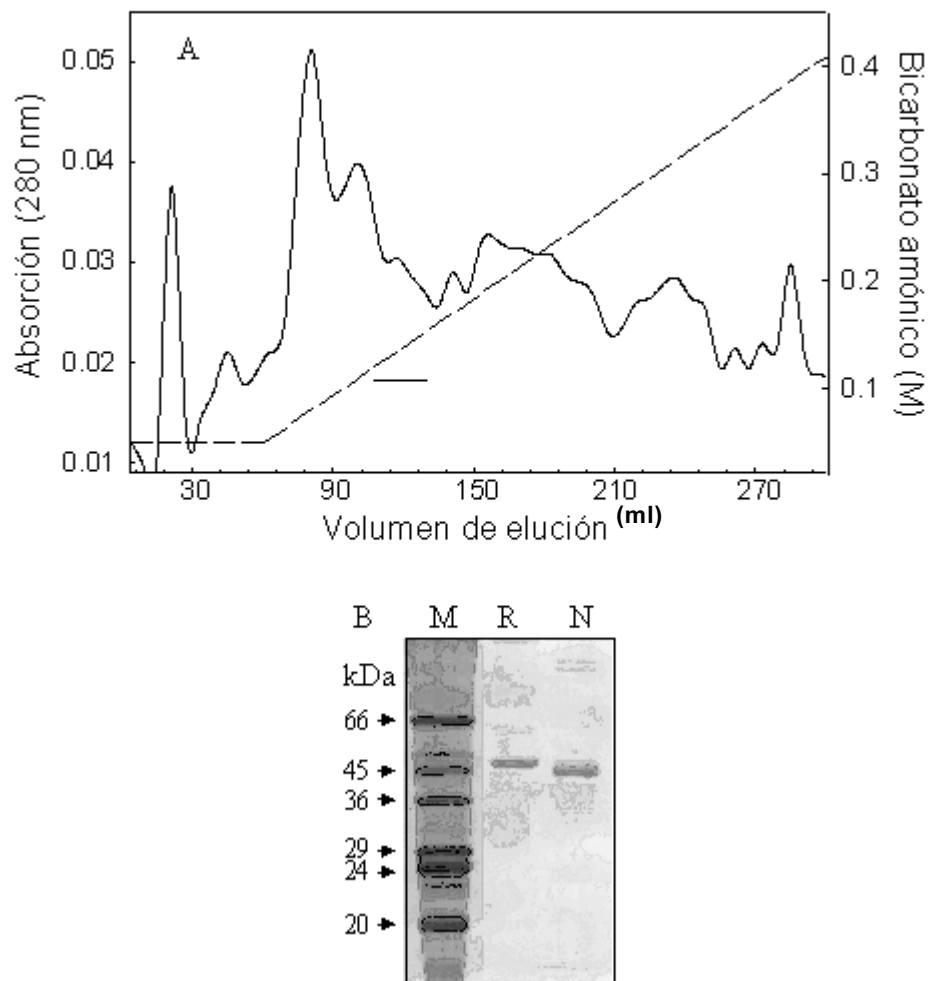


Figura 57: Aislamiento de rOle e 9. (A) Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. La absorción de las fracciones del eluido se registró a 280 nm. Con línea discontinua se representa el gradiente aplicado para la elución de la proteína. Con línea gruesa se marcan las fracciones correspondientes a rOle e 9. (B) PAGE-SDS (12%) de rOle e 9 purificada (R) y nOle e 9 (N). M, marcadores de masa molecular.

Caracterización molecular

El análisis de la secuencia NH_2 -terminal del alérgeno recombinante rOle e 9 mediante degradación de Edman resultó infructuoso, lo que podría ser un dato a favor del correcto procesamiento de la proteína, que como ya se ha visto presenta una Gln en la primera posición que se cicla impidiendo la obtención de secuencia. La composición de aminoácidos de la proteína recombinante producida mediante hidrólisis ácida y análisis automático coincide con la secuencia deducida del clon expresado.

La determinación de la masa molecular de rOle e 9 mediante espectrometría de masas fue infructuosa debido a que, por razones desconocidas, la proteína no se volatiliza.

El alérgeno recombinante, rOle e 9, presenta una masa molecular aparente de 47

kDa, valor ligeramente superior que el de nOle e 9 -45.5 kDa- (figura 57). Esta diferencia podría ser atribuida al grado de glicosilación que produce *P. pastoris*. Como ya se ha visto en esta memoria la diferencia en masa de la proteína natural, nOle e 1, y la recombinante, rOle e 1, era debida al oligosacárido rico en manosas que une *P. pastoris* a la cadena polipéptica de las proteínas secretadas. Para comprobar que rOle e 9 estaba glicosilada, se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa y se hizo reaccionar con la lectina Con A y se comparó con la respuesta de nOle e 9. Como se observa en la figura 58, la reacción fue positiva.

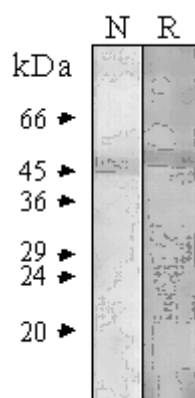


Figura 58: Análisis de la glicosilación de rOle e 9. Reacción con la lectina Con A de nOle e 9 (N) y rOle e 9 (R).

Caracterización inmunológica de rOle e 9

Se ha comparado la capacidad de unión a anticuerpos IgE de rOle e 9 y nOle e 9. Para ello se ha ensayado, mediante inmunotransferencia, el reconocimiento por parte de una mezcla de cinco sueros (figura 59A) y por 7 sueros individuales de pacientes alérgicos a olivo que presentaban IgE frente a Ole e 9 (figura 59B). El resultado demuestra que rOle e 9 es reconocida por las IgE de sueros sensibles a nOle e 9.

La unión de IgE a rOle e 9 y a nOle e 9 se midió, también, de forma cuantitativa mediante un ensayo de titulación (figura 60). Las curvas de titulación son similares aunque no idénticas, lo que podría atribuirse a la pérdida de epítomos no sólo aquellos presentes en la cadena polipéptica -algunas de las isoformas de nOle e 9 pueden estar implicadas en el reconocimiento de IgE-, sino glicosídicos. Aunque no se ha estudiado la naturaleza del grupo glicosídico que Ole e 9 tiene unido a su molécula, la mayoría de los N-oligosacáridos unidos a glicoproteínas de plantas muestran un componente glicosídico complejo con una estructura básica común que posee xilosa, y a veces, fucosa, estructuras muy antigénicas [Sturm, 1991]. Concretamente, el alergeno Ole e 1, que se ha demostrado tiene capacidad para unir IgE de pacientes alérgicos [Batanero y col., 1996], contiene dos estructuras glicosídicas mayoritarias, una “rica en manosas” y otra de tipo “híbrido” que contiene un residuo de xilosa. Como se ha mencionado en esta memoria, el oligosacárido que la levadura *P. pastoris* une a la cadena polipeptídica es rico en manosas y por tanto, diferente

del que posee la forma natural. Esta diferencia podría ocurrir, de igual forma, con las moléculas natural y recombinante de Ole e 9.

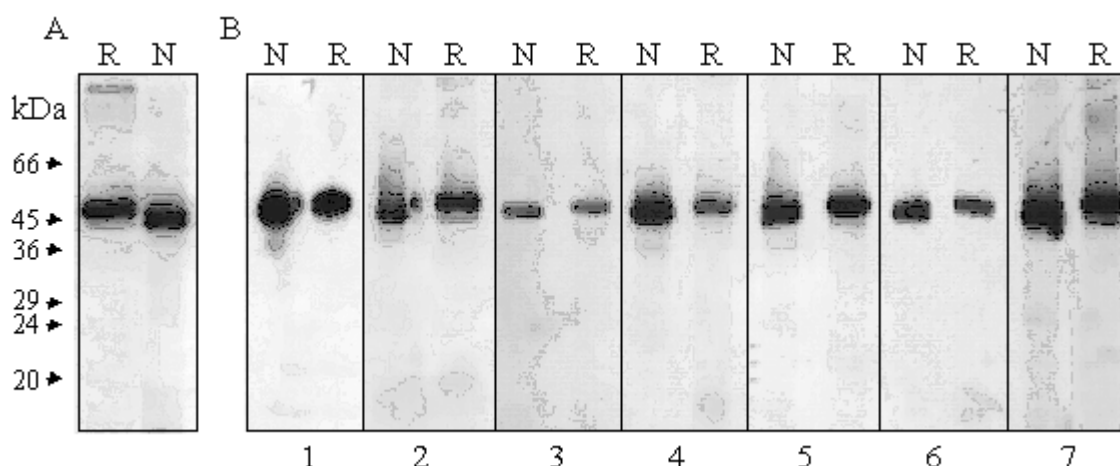


Figura 59: Inmunodetección de los alérgenos nOle e 9 (N) y rOle e 9 (R) después de someterlos a electroforesis en PAGE-SDS y transferirlos a membranas de nitrocelulosa; (A) empleando una mezcla de sueros y (B) empleando siete sueros (1-7) de pacientes alérgicos a olivo.

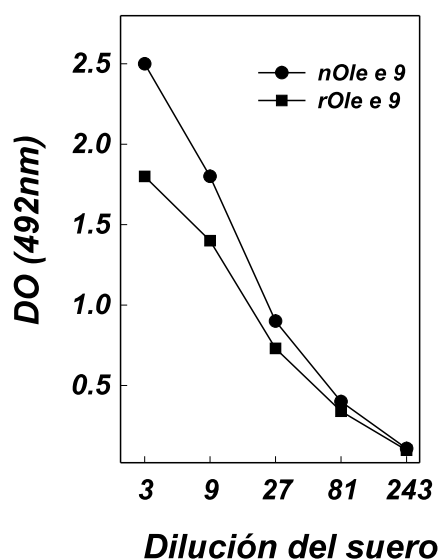


Figura 60: Curvas de titulación de la unión de IgE de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos, frente a nOle e 9 y rOle e 9 absorbidos a placas de poliestireno.

Para comprobar si rOle e 9 era equivalente inmunológicamente a nOle e 9, se realizaron ensayos de inhibición en ELISA usando una mezcla de cinco sueros. Se tapizó con una u otra proteína, y se inhibió alternativamente con las dos. Como se observa en la figura 61, ambos alérgenos presentan la misma capacidad para inhibir la unión de anticuerpos IgE al otro, indicando que ambas son capaces de saturar los epítomos IgE de la forma alternativa del alérgeno.

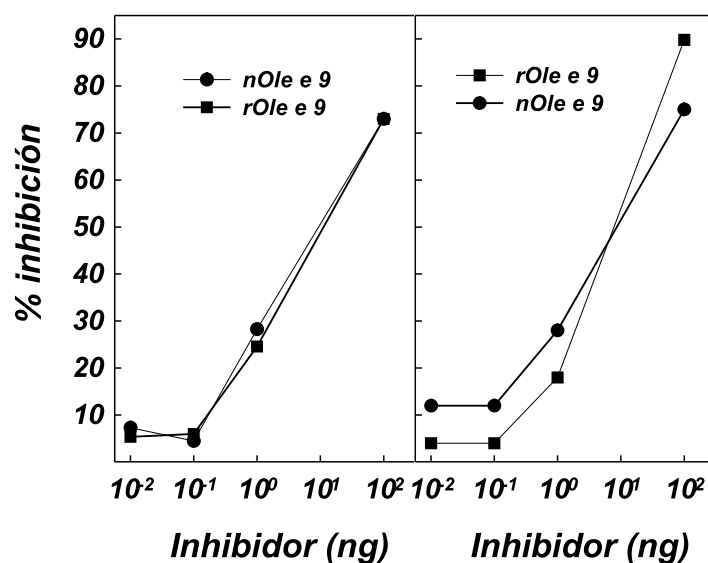


Figura 61: Curvas de inhibición en ELISA de la unión de IgE de una mezcla de cinco sueros de pacientes alérgicos a olivo a nOle e 9 (A) y a rOle e 9 (B) adsorbidos a poliestireno, utilizando como inhibidores los alérgenos nOle e 9 (●) y rOle e 9 (■).

A la vista de estos resultados, se puede concluir que se ha obtenido en *P. pastoris* un alérgeno recombinante que conserva de forma similar las propiedades inmunológicas de la proteína natural. Sin embargo, la producción del alérgeno recombinante, rOle e 9, así como su manejo, se encuentran en fase preliminar habiéndose encontrado pequeños inconvenientes, como es el bajo rendimiento obtenido en la producción, que han de ser mejorados. Posteriormente, esta molécula ha de ser validada en diagnóstico cutáneo para poder usarla con fines de diagnóstico. Por otro lado, un mayor conocimiento inmunológico del nuevo alérgeno Ole e 9 permitiría su uso, como fin último, en inmunoterapia.

El trabajo de investigación presentado en esta memoria ha aportado una serie de resultados que han permitido, por un lado, validar el sistema de expresión en la levadura *P. pastoris* para la producción de alergenios que presenten modificaciones postraduccionales, y por otro, se ha logrado el aislamiento, la caracterización molecular e inmunológica, y la producción recombinante de un nuevo alergenio del polen de olivo de alto peso molecular y notable incidencia clínica.

1.- Se ha producido una isoforma de Ole e 1 (Clon 3c), alergenio principal del polen de olivo, como proteína recombinante en la levadura *P. pastoris*. La proteína recombinante obtenida es secretada al medio extracelular por la levadura a partir de donde se ha purificado, mediante dos etapas cromatográficas, con un alto rendimiento (25 mg del alergenio purificado por litro de cultivo celular). Se ha realizado la caracterización molecular, estructural e inmunológica de la proteína recombinante, demostrándose su equivalencia con la proteína natural. También, se ha validado la eficacia de rOle e 1 en el diagnóstico de los pacientes alérgicos a olivo.

2.- Se ha producido un mutante no glicosilado de Ole e 1, mOle e 1, en la levadura *P. pastoris*. La estrategia seguida ha sido la mutación de la Asn 111, sitio de glicosilación de Ole e 1, por una Gln. La proteína obtenida es secretada al medio extracelular por la levadura lo que ha permitido, también, purificarla con un alto rendimiento. Se ha realizado la caracterización molecular, estructural e inmunológica del alergenio mutante demostrándose su equivalencia con los alergenios recombinante y natural. La equivalencia estructural entre mOle e 1 y rOle e 1 ha permitido descartar la implicación del oligosacárido de Ole e 1 en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína.

3.- Se ha purificado un nuevo alergenio del polen de olivo, Ole e 9, a partir del extracto salino, mediante tres etapas cromatográficas: dos de penetrabilidad en Sephadex G-150 y una de afinidad en phenyl-Sepharosa.

a.- El alergenio Ole e 9 es una glicoproteína ácida (pI teórico 5.6), constituida por una única cadena polipeptídica con una masa molecular de 46.4 kDa, que presenta polimorfismo.

b.- Se ha demostrado la capacidad de Ole e 9 purificada para unir anticuerpos IgE. El estudio de la frecuencia de sensibilización de los pacientes alérgicos a polen de olivo a este nuevo alergenio ha mostrado que se trata de un alergenio principal ya que es reconocido en ELISA por el 52-65% de los pacientes alérgicos.

c.- Se ha determinado parte de la estructura primaria de Ole e 9 mediante la digestión proteolítica del alérgeno con tripsina, y posterior secuenciación mediante degradación de Edman de los péptidos obtenidos.

d.- Se ha clonado el cDNA de Ole e 9, sintetizado a partir del RNA total del polen de olivo, mediante amplificación por PCR, lo que ha permitido determinar la estructura primaria completa de este alérgeno. La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los clones secuenciados confirma la naturaleza polimórfica de Ole e 9.

e.- Ole e 9 presenta homología con enzimas α -1,3-glucanasas de distintas especies y presentes en distintos tejidos. Estas enzimas están relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos, así como con procesos normales del desarrollo de las plantas.

f.- Se ha demostrado la capacidad endoglicolítica de Ole e 9 mediante ensayos enzimáticos usando como sustrato laminarina. Ole e 9 presenta una actividad específica de 38 mg de glucosa liberados por minuto y por μ mol de enzima a un pH óptimo de 5.0.

g.- El mRNA correspondiente a Ole e 9 se localiza exclusivamente en el polen, tal como demuestra el análisis por Northern blot.

h.- Ole e 9 es la primera α -1,3-glucanasa detectada en polen donde podría ejercer un papel biológico durante la formación del mismo, durante el desarrollo del tubo polínico, o bien de defensa ante el ataque de agentes patógenos.

i.- No se han detectado -mediante ensayos de inhibición en ELISA o de Northern blot- proteínas homólogas a Ole e 9 en pólenes de otras fuentes biológicas, a no ser que éstas se encuentren muy próximas filogenéticamente al olivo. Este dato indica que, en el caso de que existan proteínas homólogas a Ole e 9 en otros pólenes, su secuencia de aminoácidos no está significativamente conservada.

j.- Uno de los clones de Ole e 9 ha sido producido en la levadura *P. pastoris*, donde se ha obtenido como proteína de secreción en el medio extracelular a partir del cual se ha purificado con buen rendimiento. Esta proteína recombinante conserva las propiedades inmunológicas de la forma natural del alérgeno.

Aalberse, R.C. (2000) Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106** (2), 228.

Akdis, C.A., Blaser, K. (2000) Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **121**, 261.

Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Makinen-Kiljunen, S. (1995) Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 659.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, A., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389.

Ansari, A.A., Kihara, T.K. y Marsh, D.G. (1987) Immunochemical studies of *Lolium perenne* (rye grass) pollen allergens, Lol p I, II and III. *J. Immunol.* **139**, 4034.

Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., van Loon, L.C. (1980) Comparision of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* **47**, 79.

Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S.C., Gautier, M.F., Ciurana, C.L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J.H., Bulder, I., Aalberse, R.C. y van Ree, R. (2000) Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **122**, 20.

Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez-Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A. y Palacios, R. (1997) Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 365.

Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuch, R.L., (1996) Atability of food allergens to digestion in vitro *Nat Biotechnol.* **14**, 1269.

Baldo, B.A., Panzani, R.C., Bass, D. y Zerboni, R. (1992) Olive (*Olea europaea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins. *Mol. Immunol.* **29**, 1209.

Ballesta, F. (1998) Genética y alergia. *Allergol. Immunopathol.* **26**, 83.

Barber, D., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Armentia, A., López-Otín, C. (1989) A barley

flour inhibitor of insect alpha-amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. *FEBS Lett.* **248**, 119.

Barranco, D. y Rallo, L. (1984) Conserjería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, MAPA, Madrid.

Batanero, E., Villalba, M. y Rodríguez, R. (1994a) Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.* **31**, 31.

Batanero, E., Villalba, M., López-Otín, C. y Rodríguez, R. (1994b) Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. *Eur. J. Biochem.* **221**, 187.

Batanero, E., Villalba, M., Monsalve, R.I. y Rodríguez, R. (1996a) Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: Evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 1264.

Batanero, E., Villalba, M., Ledesma, A., Puente, X.S. y Rodríguez, R. (1996b) Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur. J. Biochem.* **241**, 772.

Batanero, E., González de la Peña, M.A., Villalba, M., Monsalve, R.I., Martín-Esteban, M. y Rodríguez, R. (1996c) Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 1401.

Batanero, E., Ledesma, A., Villalba, M. y Rodríguez, R. (1997) Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Lett.* **410**, 293.

Batanero, E., Crespo, J.F., Monsalve, R.I., Martín-Esteban, M., Villalba, M. y Rodríguez, R. (1999) IgE binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 147-153.

Best, E.A., Stedman, K.E., Bozic, C.M., Hunter, S.W., Vailes, L.D., Chapman, M.D., McCall, C. y McDermott, M.J. (2000) A recombinant house dust mite (HDM) allergen, rDer f 1, with IgE-binding activity comparable to the native allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, S168.

Bircher, A.J., Van Mell, G., Haller, E., Curty, B., Frei, P.C., (1994) IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 367.

Bjorksten, B. (1999) Allergy priming early in life. *Lancet* **353**, 167.

Blanca, M., Boulton, P.R., Brostoff, J. y González-Reguera, I. (1983) Studies of the allergens of *Olea europaea* pollen. *Clin. Allergy* **13**, 473.

Blanco, C., Crespo, J.F., Cabans, R., Vega, A., López, C. y Martínez, F. (1992) *Olea europaea* pollen allergy. *Allergy* **47**(suppl.), 77.

Blanco, C., Díaz-Perales, A., Collada, C., Sánchez-Monge, R., Aragoncillo, C., Castillo, R., Ortega, N., Álvarez, M., Carrillo, T. y Salcedo, G. (1999) Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 507.

Blumenthal, M.N., Namborrdiri, K., Mendell, N., Gleich, C., Elston, R.C. (1981) Genetic transmission of serum IgE levels. *Am. J. Med. Genet.* **10**, 219.

Boluda, L., Alonso, C. y Fernández-Caldas, E. (1998) Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 210.

Bousquet, J., Cour, P., Guerin, B., Michel, F.B. (1984) Allergy in the Mediterranean area: I. Polen counts and pollinosis of Montpellier. *Clin. Allergy* **14** (3), 249.

Bousquet, J., Guerin, B., Hewitt, B., Lim, S. y Michel, F.B. (1985) Allergy in the Mediterranean area. III. Cross-reactivity among Oleaceae pollen. *Clin. Allergy* **15**, 439.

Bousquet, J., Lockey, R. y Malling, H.-J. (1998) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 558-562.

Braback, L., Breborowicz, A., Drebor, S., Knutsson, A., Pieklik, H., Bjorksten, B. (1994) Atopic sensitization and respiratory symptoms among Polish and swedish school children. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 826.

Braback, L., Breborowicz, A., Julge, K., Knutsson, A., Riikjarv, M.A., vasar, M., (1995) Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitisation in the Baltic area. *Arch. Dis. Chil.* **72**, 487.

Brehler, R., Theissen, U., Mohr, C., Luger, T. (1997) "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy* **52**, 404.

Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Susani, M., Ahorn, H., Ebner, C. (1995) Molecular characterization Api g 1, the major allergen of celery (apium graveolens) and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens *Eur. J. Biochem.* **233**, 484.

Breiteneder, H., Sowka, S., Wagner, S., Krebitz, M., Hafner, C., Kinaciyan, T., Yeang, H.Y. y Scheiner, O. (1999) Cloning of the patatin-like latex allergen Heb v 7, its expression in the yeast *Pichia pastoris* and its immunological characterization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**, 309.

Breiteneder, H., y Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106** (1), 27.

Briner, T.J., Kuo, M.C., Keating, D.M., Rogers, B.L., Greenstein J.L. (1993) Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 7608.

Bucciaglia, P.A. y Smith, A.G. (1994) Cloning and characterization of Tag1, a tobacco anther -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Mol. Biol.* **24**, 903.

Bufe, A., Betzel, C., Schramm, G., Petersen, A., Becker, W.M., Schlaak, M., Perbandt, M., Dauter, Z. y Weber, W. (1996) Crystallization and preliminary diffraction data of a major pollen allergen. Crystal growth separates a low molecular weight form with elevated biological activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 27193.

Bungy, G.A., Rodda, S., Roitt, I., Brostoff, J. (1994) Mapping of T-cell epitopes of the major fraction of ryegrass using peripheral blood mononuclear cells from atopics and non-atopics. II Isoallergen clone 5A of *Lolium perenne* group I (Lol p 1). *Eur. J. Immunol.* **24**, 2098.

Burks, A.W., Williams, L.W., Helm, R.M., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. (1991) Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**, 172.

Bush, R.K., Sánchez, H. y Geisler, D. (1999) Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 665.

Calkhoven, P.G., Aalbers, M., Koshte, V.L., Pos, O., Oei, H.D. y Aalberse, R.C. (1987) Crossreactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three different crossreactive structure. *Allergy* **42**, 382.

Cárdaba, B., De Pablo, R., Vilches, C., Martín, E., Geller-Bernstein, C., De Andrés, B., Zaharan, Y., Del Pozo, V., Gallardo, S., De Arruda Chaves, E., Waisel, Y., Palomino, P., Kreisler, M. y Lahoz, C. (1996) Allergy to olive pollen: T-cell response from olive allergic patients is restricted by DR7-DQ2 antigens. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 316.

Cárdaba, B., Del Pozo, V., Jurado, A., Gallardo, S., Cortegano, I., Arrieta, I., Del Amo, A., Tramon, P., Florido, F., Sastre, J., Palomino, P., Lahoz, C. (1998) Olive pollen allergy searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule. *Clin. Exp. Allergy* **28** (4), 413.

Carlson, M., Hakansson, L., y Kampe, M. (1992) Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1331.

Carreira, J. y Polo, F. (1995) The allergens of *Olea europaea* and *Parietaria spp.* And their relevance in the Mediterranean area. *ACI News* **7**, 79.

Cassacuberta, H; J.M., Raventos, D., Puigdomenech, P. San Segund, B. (1992) Expression of the gene encoding the PR-like protein Prms in germinating maize embryos. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 97.

Chelliah, J y Jones D. (1990) Biochemical and immunological studies of proteins from polydnavirus Chelonius sp. near curvimaculatus. *J. Gen. Virol.* **71**, 2353.

Chen, L., Fincher, G.B., Hoj, P.B. (1993) Evolution of polysaccharide hydrolase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **268** (18), 13318.

Chen, L., Garret, P.J., Fincher, G.B., Hoj, P.B. (1995) A tetrad of ionizable amino acids is important for catalysis in barley α -glucanases. *J. Biol. Chem.* **270** (14), 8093.

Chye, M.L. y Cheung, K.Y. (1995) α -1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 395.

Clarke, A.E., Stone, B.A. (1962) α -1,3-glucan hydrolases from the grape vine (*Vitis vinifera*) and other plants. *Phytochemistry* **1**, 175.

Cook, D.G., Strachan, D.P. (1999) Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. *Thorax* **54**, 357.

Cooke, R.A., Bernhard, J.H., Hebal, S. y Stull, A. (1935) Serological evidence of immunity with co-existing sensitization in hay fever type of human allergy. *J. Exp. Med.* **62**, 733.

Cookson, W.O.C.M., Sharp, P.A., Faux, J.A., Hopkin, J.M. (1989) Linkage between Immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* **8650**, 1292.

Corsico, R. (1993) El asma polínico en Europa. En *Polen atmosférico en Europa*. (Spieksma, F., Nolard, N., Frenguelli, G. y van Moerbeke, D. eds) p 19-29. U.C.B., Bruselas.

Cote, F., Cutt, J.R., Asselin, A., Klessig, D.F. (1991) Pathogenesis-related acidic 1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 173.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **11**, 905.

Cruz-Ortega, R., Cushman, J.C., Ownby, J.D. (1997) cDNA clones encoding 1,3-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots.

D'Amato, G., Mullins, J., Nolard, N., Spieksma, F.Th.M. y Wachter, R. (1988) City spore concentrations in the European Economic Community (ECC). VII. *Oleaceae* (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*). *Clin. Allergy* **18**, 541.

D'Amato, G. y Liccardi, G. (1994) Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 210.

De Cesare, G., Pini, C., Di Felice, G., Caiaffa, M.F., Macchia, L. y Tursi, A. (1993) Purification and fine characterization of a major allergen from *Olea europaea* pollen extract. *Allergy* **48**, 248.

de Jong, E.C., Van Zijverden, M., Spanhaak, S., Koppelman, S.J., Pellegrom, H., Penninks, A.H. (1998) Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin. Exp. Allergy* **28** (6), 743.

- De Vouge, M.W., Thaker, A.J., Curran, I.H., Zhang, L., Muradia, G., Rode, H. y Vijai, H.M. (1996) Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **111**, 385.
- Diaz-Perales, A., Collada, C., Blanco, C., Sanchez-Monge, R., Carrillo, T., Aragoncillo, C., Salcedo, G. (1999) Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol.* **104** (3 Pt 1), 681.
- Díaz-Sánchez, D., Tsien, A., Fleming, J., Saxon, A. (1997) Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a helper cell 2-type pattern. *J Immunol* **158**, 2406.
- Duffy, D.L., Martin, N.G., Battistutta, D., Hopper, J.L., Mathews, J.D. (1990) Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, 1351.
- Duro, G., Colombo, P., Assunta Costa, M., Izzo, V., Porcasi, R., Di Fiore, R., Locorotondo, G., Cocchiara, R., Geraci, D. (1997) Isolation and characterization of two cDNA clones coding for isoforms of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112** (4), 348.
- Ebner, C., Szépfalusi, Z., Ferreira, F., Jilek, A., Valenta, R., Parronchi, P., Maggi, E., Romagnani, S., Scheiner, O. y Kraft, D. (1993) Identification of multiple T cell epitopes on Bet v I, the major birch pollen allergen, using specific T cell clones and overlapping peptides. *J. Immunol.* **150**, 1047.
- Ebner, C., Schenk, S., Najafian, N., Siemann, U., Steiner, R., Fischer, W.G., Hoffmann, K., Szépfalusi, Z., Scheiner, O. y Kraft, D. (1995a) Non allergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v I, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J. Immunol.* **154**, 1932.
- Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Kraft, D. (1995b) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE crossreactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 962.
- Emberlin, J.C. (1997) Grass, tree and weed pollens. En *Allergy and allergic diseases* (Kay, A.B., ed) p 497. Blackwell Sc. Publ., Oxford.

Engel, E., Richter, K., Obermeyer, G., Briza, P., Kungl, A.J., Simon, B., Auer, M., Ebner, C., Rheinberger, H.J., Breitenbach, M. y Ferreira, F. (1997) Immunological and biological properties of Bet v 4, a novel birch pollen allergen with two EF-hand calcium-binding domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 28630-28637.

Fairbanks, G., Steck, T.L. y Wallach, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606.

Fedorov, A.A., Ball, T., Mahoney, N.M., Valenta, R y Almo, S.C. (1997a) The molecular basis of allergen cross-reactivity: Crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* **5**, 33.

Fedorov, A.A., Ball, T., Valenta, R., y Almo, S.C. (1997b) X-ray crystal structures of birch pollen profilin and Phl p 2. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**, 109.

Felix, G., Meins, F. (1986) Developmental and hormonal regulation of α -1,3-glucanase in tobacco *Nicotiana tabacum* cultivar Havana 425. *Planta* **167**, 206.

Fehlner, P.F., Kochoumian, L. y King, T.P. (1991) Murine IgE and IgG responses to melittin and its analogs. *J. Immunol.* **146**, 2664.

Ferrari, E., Lodi, T., Sorbi, R.T., Tirindelli, R., Cavaggioni, A. y Spisni, A. (1997) Expression of a lipocalin in *Pichia pastoris*: secretion, purification and binding activity of a recombinant mouse major urinary protein. *FEBS Lett.* **401**, 73.

Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommengruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbacher, M., Rheinberger, H. y Ebner, C. (1996) Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *J. Exp. Med.* **183**, 599.

Freidhoff L.R., Kautzky, E.E., Meyers, D.A., Ansari, A.A., Bias, W.B. y Marsh, D.G. (1988) Association of HLA-DR3 and total serum immunoglobulin E level with human immune response to Lol p I and Lol p II allergens in allergic subjects. *Tissue antigens* **31**, 211.

Fritsch, R., Ebner, H., Kraft, D., Ebner, C. (1997) Food allergy to pumpkinseed-characterization of allergens. *Allergy* **52**, 335.

Fulcher, R.G., McCully, M.E., Setterfield, G., Sutherland, J (1976) α -1,3-glucans may be

associated with cell plate formation during cytokinesis. *Can. J. Bot.* **54**, 459.

Futamura, N., Mori, H., Kouchi, H., Shinohara, K. (2000) Male flower-specific expression of genes for polygalacturonase, pectin methylesterase and α -1,3-glucanase in a dioecious willow (*Salix gilgiana* seemen). *Plant Cell Physiol.* **41**(1), 16.

Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., Joost van Neerven, R.J., Schou, C., Lowenstein, H. y Spangfort, M.D. (1996) X-ray and MNR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 1040.

García-Casado, G., Armentia, A., Sánchez-Monge, R., Malpica, J.M., Salcedo, G. (1996) Rye flour allergens associated with baker's asthma: correlation between in vivo and in vitro activities and comparison with their wheat and barley homologues *Clin. Exp. Allergy* **26**, 428.

Garnier, J., Gibrat, J.F. y Robson, B. (1996) GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology* **266**, 540.

Gietz, R.D. y Schiestl, R.H. (1991) Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact cells using single-stranded nucleic acid as carrier. *Yeast* **7**, 253.

Gioulekas, D., Chtzigeorgiou, G., Likogiannis, S., Papakosta, D., Mpalamoutis, C., Spiekma F.Th.M. (1991) *Olea europaea* 3-year pollen record in the area of Thessaloniki, Greece and its sensitizing significance. *Aerobiologia* **7**, 57.

González, E., Monsalve, R., Puente, X.S., Villalba, M. y Rodríguez, R. (1999) Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization. *J. Pept. Res.* **55** (1), 18.

González, R., Zapatero, L., Caravaca, F., Carreira, J. (1991) Identification of soybean proteins responsible for respiratory allergies *Int. Arch. Allergy Immunol.* **95**, 53.

Grinna, L.S. Tschopp, J.F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**, 107.

Gruner, R. Y Pfizner, U.M. (1994) The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* **220**, 247.

Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997) Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment

for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.

Hanfrey, C., Fife, M., Buchanan-Wollaston, V. (1996) Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **30**, 597.

Hayek, B., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W.R., Valent, P., Vrtala, S., Niederberger, V., Twardosz, A., Kraft, D. y Valenta, R. (1998) Molecular and immunologic characterization of a highly cross-reactive two EF-hand calcium-binding alder pollen allergen, Aln g 4: structural basis for calcium-mediated IgE recognition. *J. Immunol.* **161**, 7031-7039.

Hemmann, S., Ismail, C., Blaser, K., Menz, G., Cramer, R. (1998) Skin-test reactivity and isotype-specific immune responses to recombinant Asp f 3, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Exp. Allergy* **28**, 860.

Henning, J., Dewey, R.E., Cutt, J. R., Klessig, D.F. (1993) Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of α -1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **10**, 1089.

Herbert, C.A., King, C.M., Ring P.C., Holgate, S.T., Stewart, G.A., Thompson, P.J. y Robinson, C. (1995) Augmentation of permeability in bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p 1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**, 369-378.

Hesse, M. (1991) Cytology and morphogenesis of pollen and spores. *Progress in Botany* **52**, 19.

Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. y Dreyer, W. (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein sequencer. *J. Biol. Chem.* **256**, 7990.

Hewitt, C.R., Brown, A.P., Hart, B.J., Pritchard, D.I. (1995) A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J. Exp. Med.* **182**, 1537.

Higgins, J.A., Thorpe, C.J., Hayball, J.D., O'Hehir, R.E., Lamb, J. (1994) Overlapping T-cell epitopes in the group I allergens of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J. Allergy Clin. Immunol.* **93**, 891.

Hiller, K.M., Lubahn, B.C. y Klapper, D.G. (1998) Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. *Scand. J. Immunol.* **48**, 26.

Hino, K., Yamamoto, S., Sano, O., Taniguchi, Y., Kohno, K., Usui, M., Fukuda, S.,

Hanzawa, H., Haruyama, H., Kurimoto, M. (1995) Carbohydrate structures of the glycoprotein allergen Cry j 1 from japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *J. Biochem.* **117**, 289.

Hinton, D.M., Pressey, R. (1980) Glucanase in fruits and vegetables. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **105**, 499.

Hird, D.L., Dawn, W.I., Hodge, R., Smart, S., Paul, W., y Scott, R. (1993) The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to α -1,3-glucanases. *Plant J.* **4**, 1023.

Hirs, C.H.N. (1967) Performic acid oxidation. *Meth. Enzymol.* **11**, 197.

Hoffmann-Sommergruber, K., Vanek-Krebitz, M., Radauer, C., Wen, J., Ferreira, F., Scheiner, O. (1997) Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions *Gene* **197**, 91.

Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Ahorn, H., Ebner, C., Laimer da Camara Machado, M., Puhlinger, H. (1999) Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1 *Clin. Exp. Allergy* **29**, 840.

Hoffmann-Sommergruber, K. (2000) Plant allergens and pathogenesis-related proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **122**, 155.

Hoj, P.B., Slade, A.M., Wettenhall, R. H., Fincher, G. B. (1988) Isolation and characterization of a (1,3)- α -glucan endohydrolase from germinating barley (*Hordeum vulgare*): amino acid sequence similarity with barley (1,3-1,4)- α -glucanases. *FEBS Lett.* **230**, 67.

Holt, P.G., McMenamin, C., Nelson, D. (1990) Primary sensitisation to inhalant allergens during infancy. *Pediatr. Allergy Immunol.* **1**, 3.

Hopkin, J.M. (1997) Mechanisms of enhanced prevalence of asthma and atopy in developed countries. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 788.

Hoyne, G.F., O'Hehir, R.E., Wraith, D.C., Thomas, W.R., Lamb, J.R. (1993) Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T epitope in naive and sensitized mice. *J. Exp. Med.* **178**, 1783.

Hsi, K.L., Chen, L., Hawke, D.H., Zieske, L.R. y Yuang, P.M. (1991) A general approach for characterizing glycosilation sites of glycoproteins. *Analyt. Biochem.* **198**, 238.

Hsieh, L.S., Moos, M., Lin, Y. (1995) Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening *J. Allergy Clin. Immunol.* **96**, 960.

Inschlag, C., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Ahorn, H., Ebner, C., scheiner, O. (1998) Biochemical characterization of Pru a 2, a 23 kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**, 22.

Ipsen, J., Schwartz, B., Wihl, J.A., Petersen, B.N., Munch, E.P., Janniche, H. y Lowenstein, H. (1988) Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. *Allergy* **43**, 370-377.

Izumi, H., Adachi, T., Fujii, N., Matsuda, T., Nakamura, R., Tanaka, K. (1992) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a major allergenic protein in rice seeds: homology of the deduced amino acid sequence with members of alpha-amylase/trypsin inhibitory family. *FEBS Lett.* **302**, 213.

Jenkins, M., Hopper, J., Giles, G. (1997) Regressive logistic modelling of familial aggregation for asthma in 7,394 population-based nuclear families. *Genet. Epidemiol.* **14**, 317.

Jensen-Jarolim, E., Santner, B., Leitner, A., Grimm, R., Scheiner, O., Ebner, C. (1998) Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**, 103.

Johnson, P., Marsh, D.G. (1965) "Isoallergens from rye grass pollen. *Nature* **206**, 935.

Juergens, D.H., Huber, R.E., Matthews, B.W. (1999) Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between -galactosidase and other glycohydrolases. *Protein Sci.* **8**, 122.

Kernerman, S.M., McCullough, D.R. y Ownby, D.R. (1992) Evidence of cross-reactivity between olive, ash, privet and russian olive tree pollens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**, 187.

King, T.P., Norman, P.S. y Connell, J.T. (1964) Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen. II. *Biochemistry* **3**, 458.

King, T.P., Hoffman, D., Löwenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E. y Thomas, W. (1994) Allergen nomenclature. *Bull. WHO* **72**, 797.

Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M., Becker, W.M. (1999) Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 265.

Klein, C., de Lamotte-Guery, F., Gautier, F., Moulin, G., Boze, H., Joudrier, P. y Gautier, M.F. (1998) High-level secretion of a wheat lipid transfer protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **13**, 73.

Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., Peng, J.L. (1997) Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin. Exp. Allergy* **27**, 246.

Kobayashi, I., Sakiyama, Y., Tame, A., Kobayashi, K. y Matsumoto, S. (1996) IgE and IgG4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of *Dermatophagoides pteronyssinus* group II antigen (Der p 2). *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 638.

Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., Marz, L., Hard, K., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. (1993) Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honey bee venom phospholipase A2. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1193.

Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lahoz, C., Lauzurica, P., Tricas, L., Diez, R., Maruri, N., Galocha, B., Florez, R., Maestre, Y., Gurbindo, C. y Garcia, R. (1985) A glycoprotein as the major antigen in *Olea europaea*. *Ann. Allergy* **55**, 289.

Lauzurica, P., Gurbindo, C., Maruri, N., Galocha, B., Díaz, R., González, J., García, R. y Lahoz, C. (1988a) Olive (*Olea europaea*) pollen allergens-I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol. Immunol.* **25**, 329.

Lauzurica, P., Maruri, N., Galocha, B., González, J., Díaz, R., Palomino, P., Hernández,

D., Garcia, R. y Lahoz, C. (1988b) Olive (*Olea europaea*) pollen allergens - II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol. Immunol.* **25**, 337.

Ledesma, A., Rodríguez, R. y Villalba, M. (1998a) Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy* **53**, 520.

Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E. y Rodríguez, R. (1998b) Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J. Biochem.* **258**, 454.

Ledesma, A., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2000a) Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca²⁺-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett.* **466**, 192.

Ledesma, A., Villalba, M., Vivanco, F. y Rodríguez, R. (2000b) Ole e 8, a new Ca-binding allergen from olive pollen: IgE-binding dependence of Ca-bound and presence in other pollens. (Enviado a publicar).

Leubner-Metzger, G. y Meins, F. (1999) Functions and regulation of plant α -1,3-glucanases (PR-2). In Pathogenesis-Related Proteins in Plants (Datta, S.K. y Muthukrishnan, S., eds), pp. 49-76. CRC Press LLC, Boca Raton, USA.

Li, P.K.T., Lai, C.K.W., Poon, A.S.Y., Ho, A.S.S., Chan, C.H.S. y Lai, K.N. (1995) Lack of association between HLA-DQ and -DR genotypes and asthma in southern Chinese patients. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 323.

Liccardi, G., D'Amato, M. y D'Amato, G. (1996a) *Oleaceae* pollinosis: A review. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **111**, 210.

Liccardi, G., Kordash, T.R., Russo, M., Noschese, P., Califano, C., D'Amato, M. y D'Amato, G. (1996b) Why are nasal and bronchial symptoms mostly perennial in patients with monosensitization to *Olea europaea* pollen allergens? *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **6**, 371.

Linthorst, HJM., van Loon, L.C., van Rossum, CMA., Mayer, A., Bol, J. F., van Roekel JSC., Meulenhoff, JS., Cornelissen, BJC. (1990) Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**, 252.

Lombardero, M., Quirce, S., Duffort, O., Barber, D., Carpizo, J., Chamorro, M.J., Lezaun,

- A. y Carreira, J. (1992) Monoclonal antibodies against *Olea europaea* major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantification of the allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 884.
- Lombardero, M., Barbas, J.A., Moscoso del Prado, J. y Carreira, J. (1994) cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e 1*. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 765.
- Lotan, T., Ori, N., y Fluhr, R. (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell* **1**, 881.
- Lympany, P., Welsh, K.I., Cochrane, G.M., Kemeny, D.M. y Lee, T.H. (1992) Genetic analysis of the linkage between chromosome 11q and atopy. *Clin. Exp. Allergy* **22**, 1085.
- Lynch, N.R., Thomas, W.R., Chua, Y., García, N., Diprisco, M.C., López, R. (1994) In vivo biological activity of recombinant Der p 2 allergen of house dust mite. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**, 70.
- Macchia, L., Aliani, M, Caiaffa, M.F., Carbonara, A.M., Gatti, E., Iacobelli, A., Strada, S., Casella, G. y Tursi, A. (1987) Monitoring of atmospheric conditions and forecast of olive pollen season. *Experientia* **51** (Suppl.), 95.
- Macchia, L., Caiaffa, M.F., D'Amato, G. y Tursi, A. Allergenic significance of *Oleaceae* pollen. (1991) En *Allergenic pollen and pollinosis in Europe* (D'Amato, G., Spieksma, F.Th.M. y Bonini, S. eds.), p.87. Blackwell Sc. Publ., Oxford.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Manousis, T. y Moore, N.F. (1988) Exploited plants. *The olive tree biologist.* **35**, 7.
- Marsh, D.G., Meyers, D.A., Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Roebber, M., Norman, P.S., Hsu, S.H. y Bias W.B. (1982) HLA-Dw2: a genetic marker for human innume response to short ragweed allergen Ra5. II Response after ragweed innunotherapy. *J. Exp. Med.* **155**, 1452-1463.
- Marsh, D.G. y col., (1994) Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum IgE concentrations. *Science* **264**, 1152.
- Martínez-Ripoll, M., Albert, A., Villalba, M., Rodríguez, R. (1998) Cristalización y estudios preliminares de difracción de rayos X de Ole e 1, el alergen mayoritario de polen

de olivo. XXI Congreso de SEBBM, Sevilla, 20-23 de Septiembre de 1998.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Gavilanes, J.G. (1997) Secretion of recombinant pro- and mature fungal -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr. Purif.* **12**, 315.

Martín-Orozco, E., Cárdbaba, B., del Pozo, V., de Andrés, B., Villalba, M., Gallardo, S., Rodríguez-García, M.I., Fernández, M.C., Alché, J.D., Rodríguez, R., Palomino, P. y Lahoz, C. (1994) Ole e I: Epitope mapping, cross-reactivity with other *Oleaceae* pollens and ultrastructural localization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104**, 160.

Mazur, G., Baur, X. y Liebers, V. (1990) Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family *Chironomidae*: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monogr. Allergy* **28**, 121.

Mazzoni, M.R., Artemyev, N.O. y Hamm, H.E. (1996) Proteolytic fragmentation for epitope mapping. *Methods Mol. Biol.* **66**, 109-120.

McDermott, M.J., Weber, E., Hunter, S., Stedman, K.E., Best, E., Frank, G.R., Wang, R., Escudero, J., Kuner, J. y McCall, C. (2000) Identification, cloning, and characterization of a major cat flea salivary allergen (Cte f 1). *Mol. Immunol.* **37**, 361.

Meier, H., Buchs, L., Buchala, A.J., Homewood, T. (1981) (1-3)- β -D-Glucan (callose) is a probable intermediate in biosynthesis of cellulose fibres. *Nature* **289**, 821.

Melen, E., Pomes, A., Vailes, L.D., Arruda, L.K. y Chapman M.D. (1999) Molecular cloning of Per a 1 and definition of the cross-reactive Group 1 cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 859.

Mena, M., Sanche-Monge, R., Gomez, L., Salcedo, G., Carboner, P.A. (1992) A major barley allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monomeric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant Mol. Biol.* **20**, 451.

Menéndez-Arias, L., Moneo, I., Domínguez, J., Rodríguez, R. (1988) Primary structure of the major allergen from yellow mustard seeds, Sin a 1. *Eur. J. Biochem.* **177**, 159.

Menz, G., Dolecek, C., Schönheit-Kenn, U., Ferreira, F., Moser, M., Schneider, T., Suter, M., Boltz-Nitulescu, G., Ebner, C., Kraft, D. y Valenta, R. (1996) Serological and skin-test

diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 50-60.

Metzler, W.J., Valentine, K., Roebber, M., Marsh, D.G., Mueller, L. (1992) Proton resonance assignments and three-dimensional solution structure of the ragweed allergen Amb a V by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 8697.

Miele, R.G., Castellino, F.J., Bretthauer, R.K. (1997) Characterization of the acidic oligosaccharides assembled on the *Pichia pastoris* expressed recombinant kringle 2 domain of human tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**, 79.

Moffatt, M.F., Cookson, W.O. (1998) The genetics of asthma. Maternal effects in atopic disease. *Clin. Exp. Allergy* **28** (suppl 1), 56.

Mohapatra, S.S., Hill, R.D., Schon, A.H. (1990) Molecular cloning of allergens: Progress and perspectives. *Aerobiologia*, **6**, 205.

Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Menéndez-Arias, L., López-Otín, C., Villalba, M., Rodríguez, R. (1993) Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j 1E: detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.* **293**, 625.

Monsalve, R.I., Lu, G. y King, T.P. (1999) Expression of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expr. Purif.* **16**, 410.

Moore, P.D., Webb, J.A. y Collinson, M.E. (1991) *Pollen analysis*, p. 1. Blackell, Oxford.

Moser, M., Cramer, R., Brust, E., Suter, M., Menz, G. (1994) Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *J. Allergy Clin. Immunol.* **93**, 1.

Muller, U.R., Dudler, T., Schneider, T., Cramer, R., Fischer, H., Skribic, D., Maibach, R., Blaser, K., Suter, M. (1995) Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J. Allergy Clin. Immunol.* **96**, 395.

Mygind, N., Dahl, R., Pedersen, S., Thestrup-Pedersen, K. (1996) Allergens. En *Essential Allergy* p. 81. Blackell, Oxford.

Neale, A.D., Wahleithner, J.A., Lund, M., Bonnett, H.T., Kelly, A., Meeks Wagne, D.R., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1990) Chitinase, α -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* **2**, 263.

Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375.

Neuhaus, J.M., Fritin, B., Linthorst, H.J.M., Meins, F., Mikkelsen, J.D., Rals, J. (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol. Biol.* **14**, 102.

Niederberger, V., Laffer, S., Fröschi, R., Kraft, D., Rumpold, H., Kapiotis, S., Valenta, R. y Spitzauer, S. (1998a) IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 258.

Niederberger, V., Pauli, G., Grönlund, H., Fröschi, R., Rumpold, H., Kraft, D., Valenta, R. y Spitzauer, S. (1998b) Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: A quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 579.

Niederberger, V., Hayek, B., Vrtala, S., Laffer, S., Twardosz, A., Vangelista, L., Sperr, W.R., Valent, P., Rumpold, H., Kraft, D., Ehrenberger, K., Valenta, R. y Spitzauer, S. (1999) Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7. *FASEB J.* **13**, 843-856.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1.

Nilsen, B.M., Sletten, K., Smestad-Paulsen, B., O'Neill, M., vam Halbek, H. (1991) Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v 2 from the pollen of mugwort (*Artemisia vulgaris*). *J. Biol. Chem.* **266**, 2660.

Noon, L., Cantab, B.C. y Eng, F.R.C.S. (1911) Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* **1**, 1572.

Nowak, D., Heinrich, J., Jorres, R., Wassmer, G., Berger, J., Beck, E., (1996) Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: West and

East Germany. *Eur. Respir. J.* **9**, 2541.

Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S. Y Fluhr, R. (1990) A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J.* **9** (11), 3429.

Pabst, H.F. (1997) Immunodulation by breast-feeding. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16** (10), 991.

Pastorello, E.A., Ortolani, C., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Borga, A., Bengtsson, A., Incorvaia, C., Berti, C. y Zanussi, C. (1994) Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plumm and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**, 699.

Pastorello, E.A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R. (1998) Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 531.

Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M., Monza, M. (1999a) The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 520.

Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M. (1999b) Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 1099.

Pauli, G., Oster, JP., Deviller, P., Heiss, S., Bessot, JC., Susani, M., Ferreira, F., Kraft, D., Valenta, R. (1996) Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2: Diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 1100.

Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F., Ryals, J. (1990) Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 98.

Peitsch, M.C. (1995) Protein modeling by e-mail. *Biotechnology* **13**, 658-660.

Peitsch, M.C. (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274-279.

Pérez, M., Ishioka, G.Y., Walker, L.E. y Chesnut, R.W. (1990) cDNA cloning and

immunological characterization of the ryegrass allergen *Lol p I*. *J. Biol. Chem.* **265**, 16210.

Petersen, A., vieth, S., Aulepp, H., Schlaak, M., Becker, W.M. (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **98**, 805.

Petersen, A., Grobe, K., Lindner, B., Schlaak, M. y Becker, W.M. (1997) Comparison of natural and recombinant isoforms of grass pollen allergens. *Electrophoresis* **18**, 819.

Peumans, W. J., Barre, A., Deerycke, V., Rougé, P., Zhang, W., May, G., Delcour, J.A., van Leuven, F., van Damme, J. M (2000) Purification, characterization and structural analysis of an abundant α -1,3-glucanase from banana fruit. *Eur. J. Biochem* **267**, 1188.

Rautiainen, J., Auriola, S., Rouvinen, J., Kauppinen, J., Zeiler, T., Novikov, D., Virtanen, T. y Mantylarvi, R.A. (1998) Molecular and crystal properties of Bos d 2, an allergenic protein of the lipocalin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 746.

Regalado, A.P., Ricardo, C.P. (1996) Study of the intercellular fluid of healthy *Lupinus albus* organs. Presence of a chitinase and a thaumatin-like protein. *Plant Physiol.* **110**, 227.

Rodríguez, R., Villalba, M., Monsalve, R.I., Batanero, E., Ledesma, A., González, E., Tejera, M.L., Huecas, S. García, M. y García, I. (1998) Perfiles de reconocimiento alergénico del polen de olivo. Aplicación en la diagnosis e inmunoterapia. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)* **92**, 253.

Rogers, B.L., Bond, J.L., Craig, S.J., Nault, A.K., Segal, D.B., Morgenstern, J.P., Chen, M.-S., Bizinkauskas, C.B., Counsell, C.M., Lussier, A.M., Luby, T., Kuo, M.-C., Briner, T.J. y Garman, R.D. (1994) Potential therapeutic recombinant proteins comprised of peptides containing recombined T cell epitopes. *Mol. Immunol.* **31**, 955.

Roggen, H.P.J.R., Stanley R.G. (1969) Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta* **84**, 295.

Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423.

Saarinen, U.M., Kajosaari, M. (1995) Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet* **346**, 1065.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (Nolan, C., ed), vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F.J., Barber, D. y Salcedo, G. (1999a) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J. Allergy Clin. Immunol* **103**, 514.

Sanchez-Monge, R., Blanco, C., Perales, A., Collada, C., Carrillo, T., Aragoncillo, C., Salcedo, G. (2000) Class I chitinases, the panallergens responsible for the latex-fruit syndrome, are induced by ethylene treatment and inactivated by heating. *J Allergy Clin Immunol*. **106** (1 Pt 1), 190.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463.

Schramm, G., Kahlert, H., Suck, R., Weber, B., Stuwe, H.T., Muller, W.D., Bufe, A., Becker, W.M., Schlaak, M.W., Jager, L., Cromwell, O. y Fiebig, H. (1999) "Allergen engineering". Variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J. Immunol*. **162**, 2406.

Scheiner, O., Kraft, D. (1995) Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy*. **50** (5), 384.

Scheurer, S., Metzner, K., Haustein, D., Vieths, S. (1997) Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen *Mol. Immunol*. **34**, 619.

Schmid, P., Peeters, A.G., Wahl, R. y Wutrich, B. (1993) Ash tree hay fever in Switzerland. *J. Allergy Clin. Immunol*. **91**, 278 (Abstract).

Schulz, O., Laing, P., Sewell, H.F., Shakib, F. (1995) Der p 1, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). *Eur. J. Immunol*. **25**, 3191.

Sessa, G., Fluhr, R. (1995) The expression of an abundant transmitting tract-specific endoglucanase (Sp41) is promoter-dependent and not essential for the reproductive physiology of tobacco. *Plan Mol. Biol*. **29**, 969.

Shakib, F., Schulz, O., Sewell, H. (1998) A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity *Immunol. Today* **19**, 313.

Sharp, P.A., Sugden, B. y Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3005.

- Shinshi, H., Wenzler, H., Neuhaus, J.M., Felix, G., Hofsteenge, J., Meins, F. (1988) Evidence of amino and carboxyl-terminal processing of a plant defense-related enzyme primary structure of tobacco prepro- α -1,3-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5541.
- Smith, A.M., Chapman, M.D. (1996) Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site-directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. *Mol. Immunol.* **33**, 399.
- Smith, P.M., Suphioglu, C., Griffith, I.J., Theriault, K., Knox, R.B. y Singh, M.B. (1996) Cloning and expression in yeast *Pichia pastoris* of a biologically active form of Cyn d 1, the major allergen of Bermuda grass pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **98**, 331.
- Snowboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Schiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E., Schmid, E., Vicente, O., Heberle-Bors, E., Ahorn, H., Breitenbach M. (1995) Isoforms of Bet v1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **270**, 2607.
- Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19.
- Sowka, S., Hsieh, L-D., Krebitz, M., Akassawa, A., Marin, B., Starrett, D., (1998a) Identification and cloning of Prs a 1, a 32 kDa major allergen of avocado and its expression in *Pichia pastoris* *J. Biol. Chem.* **273**, 28091.
- Sowka, S., Wagner, S., Krebitz, M., Arija-Mad-Arif, S., Yusof, F., Kinaciyan, T., Brehler, R., Scheiner, O. y Breiteneder, H. (1998b) cDNA cloning of the 43-kDa latex allergen Hev b 7 with sequence similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 213.
- Stewart, G.A. y Thompson, P.J. (1996) The biochemistry of common aeroallergens. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 1020.
- Stone, B.A., Clarke, A.E. (1992) Chemistry and biology of plant 1,3- β -glucans, *La Trobe University Press*, Victoria, Australia.
- Sturm, A. (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of two secreted carrot glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 169.
- Sunderasa, E., Hamzah, S., Hamid, S., Ward, M.A., Yeang, H.Y., Cardoso, M.J. (1995) Latex B-Serum α -1,3-glucanase (Hev b II) and a component of the microhelix (Hev b IV) are major latex allergens. *J. Nat. Rubb. Res.* **10** (2), 82.

- Suphioglu, C., Ferreira, F. y Knox, R.B. (1997) Molecular cloning and immunological characterization of Cyn d 7, a novel calcium-binding allergen from Bermuda grass pollen. *FEBS Lett.* **402**, 167-172.
- Takai, T., Yokota, T., Yasue, M. (1997) Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* **15**, 754.
- Tame, A., Sakiyama, Y., Kobayashi, I., Terai, I. y Kobayashi, K. (1996) Differences in titres of IgE, IgG4 and other IgG subclass anti-Der p 2 antibodies in allergic and non-allergic patients measured with recombinant allergen. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 43.
- Tang, B., Banerjee, B., Greenberger, P.A., Fink, J.N., Kelly, K.J. y Kurup, V.P. (2000) Antibody binding of deletion mutants of Asp f 2, the major *Aspergillus fumigatus* allergen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 1128.
- Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M. y McKean, D.J. (1978) Polyquaternary amines prevent peptide loss from sequenator. *Anal. Biochem.* **84**, 622.
- Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E. y Rodríguez, R. (1999) Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 797-802.
- Toriyama, K., Okada, T., Watanabe, M., Ide, T., Ashida, T., Xu, H. y Singh, M.B. (1995) A cDNA clone encoding an IgE-binding protein from *Brassica* anther has significant sequence similarity to Ca^{2+} -binding proteins. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1157-1165.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350.
- Trimble, R.B., Aatkinson, P.H., Tschopp, J.F., Townsend, R.R., Maley, F. (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **266**, 22807.
- Tretter, V., Altmann, F., Marz, L. (1991) Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur. J. Biochem.* **199**, 647.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., Grinna, L. (1987) High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **5**, 1305.

Vailes, L.D., Kinter, M.T., Arruda, L.K. y Chapman, M.D. (1998) High-level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 274.

Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Silaber, P., Deviller, P. (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* **175**, 377.

Valenta, R. y Kraft, D. (1995) Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Cur. Opin. Immunol.* **7**, 751.

Valenta, R., Steinberger, P., Duchêne, M. y Kraft, D. (1996) Immunological and structural similarities among allergens: Prerequisite for a specific and component-based immunotherapy of allergy. *Immunol. Cell Biol.* **74**, 187.

Valenta, R., Flicker, S., Eibensteiner, P., Steinberger, P., Laffer, S., Dolecek, C. y Kraft, D. (1997) Recombinant-allergen specific antibody fragments: tools for diagnosis, prevention and therapy of type I allergy. *Biol. Chem.* **378**, 745.

Valenta, R., Vrtala, S., Laffer, S., Spitzauer, S. y Kraft, D. (1998a) Recombinant allergens. *Allergy* **53**, 552.

Valenta, R., Almo, S., Ball, T., Dolecek, C., Steinberger, P., Laffer, S., Eibensteiner, P., Flicker, S., Vrtala, S., Spitzauer, S., Valent, P., Depenoux, S., Kraft, D., Bancherau, J. y Lebecque, S. (1998b) The immunoglobulin E-allergen interaction: a target for therapy of type I allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**, 167.

Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B. y Kraft, D. (1999) The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CDR and CRIT). *Clin. Exp. Allergy* **29**, 896.

Vallier, P., Dechamp, C., Valenta, R., Vial, O. y Deviller, P. (1992) Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin. *Clin. Exp. Allergy* **22**, 774.

Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D. (1995) Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 538.

van Eldik, G.J., Wingens, M., Ruiter, R.K., van Herpen, M.M., Schrauwen, J.A., Wullems, G.J. (1996) Molecular analysis of a pistil-specific gene expressed in the stigma and cortex

of *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.* **30**, 171.

van-Neerven, R.J., van de Pol, M.M., Wierenga, E.A., Aalberse, R.C., Jansen, H.M., Kapsenberg, M.L. (1994) Peptide specificity and HLA restriction do not dictate lymphokine production by allergen-specific T-lymphocyte clones. *Immunology* **82**, 351.

Van Ree, R., Voitenko, V., van Leeuwen W.A., Aalberse, R.C. (1992) Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int. Arch Allergy Immunol.* **98**, 97.

van Ree, R., van Leeuwen, W.A., Bulder, I., Bond, J. y Aalberse, R.C. (1999b) Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in in vitro diagnostics for cat allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 1223.

Varghese, J.N., Garrett, T.P.J., Colman, P.M., Chen, L., Hoj, P.B., y Fincher, G.B. (1994) Three-dimensional structures of two plant α -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2785.

Vela, C., Platas, C., Gurbindo, C., Tricas, L., Subiza, E., García, R. y Lahoz, C. (1982) Fractionation and biological characterization of *Olea europaea* pollen extract. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **68**, 289.

Villalba, M., López-Otín, C., Martín-Orozco, E., Monsalve, R.I., Palomino, P., Lahoz, C. y Rodríguez, R. (1990) Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea europaea* pollen and N-terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 523.

Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L.M., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C. y Rodríguez, R. (1993) Amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen (*Olea europaea*). *Eur. J. Biochem.* **216**, 863.

Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C. y Rodríguez, R. (1994) Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J. Biol. Chem.* **269**, 15217.

Vinay, P. y Lewis, W.H. (1986) Pollen morphology, allergenicity and aerobiology of the Oleaceae. 3rd International Conference on Aerobiology, Basel (Abstract 56).

Van de Rhee, M.D., Lemmers, R., Bol, J.F. (1993) Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic α -1,3-glucanase genes. *Plant Mol. Biol.* **21**, 451.

van Ree, R., van Leeuwen, W.A. y Aalberse, R.C. (1998) How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 184.

van Ree, R., van Leeuwen, W.A., Akkerdaas, J.H. y Aalberse, R.C. (1999) How far can we simplify in vitro diagnostics for Fagales tree pollen allergy? A study with three whole pollen extracts and purified natural and recombinant allergens. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 848.

van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L., Lerouge, P. (2000) Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem.* **275** (15), 11451.

Vögeli-Lange, R., Fründt, C., Hart, C.M., Nagy, F., Meins, F. (1994) Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I -1,3-glucanase B promoter. *Plant Mol. Biol.* **25**, 299.

von Mutis, E., Martínez, F.D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Roell, G., Thiemann, H.H. (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**, 358.

von Mutis, E. (1999) Air pollution and asthma. En: Bousquet, J., Yssel, H., editores. Lung biology in health and disease: immunotherapy in asthma. New York: Marcel Dekker; 497.

Vrtala, S., Susani, M., Sperr, W.R., Valent, P., Laffer, S., Dolecek, C., Kraft, D. y Valenta, R. (1996) Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (*Phleum pratense*) allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5). *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 781.

Vrtala, S., Ball, T., Spitzauer, S., Pandjaitan, B., Suphioglu, C., Knox, B., Sperr, W.R., Valent, P., Kraft, D. y Valenta, R. (1998) Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation. *J. Immunol.* **160**, 6137.

Wahl, R., Schmid, P. y Wüthrich, B. (1993) In vitro investigation of cross reactivity between birch and ash pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **91**, 278 (Abstracts).

Ward, E.R., Payne, G.B., Moyer M.B., Williams, S.C., Dincher, S.S., Sharkey, K., Beck, J., Taylor, H.T., Ahl-Goy, P., Meins, F., Ryals, J. (1991) Differential regulation of -1,3-glucanase mRNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiol.* **96**, 390.

- Waysel, Y., Geller-Bernstein, C., Keynan, N. y Arad, G. (1996) Antigenicity of the pollen proteins of various cultivars of *Olea europaea*. *Allergy* **51**, 819.
- Welling, G.W., Weijer, W.J., Vaan der Zee, R., Welling-Wester S. (1985) Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* **188**, 215.
- Wheeler, A.W., Hickman, B.E. y Fox, B. (1990) Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europaea*) pollen. *Mol. Immunol.* **27**, 631.
- Wheeler, A.W. (1992) Hypersensitivity to the major allergen of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Clin. Exp. Allergy* **22**, 1052.
- White, C.E., Kempf, N.M., Komives, E.A. (1994) Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure* **2**, 1003.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sánchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. y Hochstrasser, D.F. (1998) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. En *2-D proteome analysis protocols* (Link, A.J., ed). Humana press, New Jersey.
- Worral, D., Hird, D.L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J., Scott, R. (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* **4**, 759.
- Xu, P., Wang, J., Fincher, G.B. (1992) Evolution and differential expression of the 1,3- -glucan endohydrolase encoding gene family in barley, *Hordeum vulgare*. *Gene* **120**, 157.
- Yagami, T., Stao, M. Nakamura, A., Komiyama, T., Kitagawa, K., Akasawa, A., Ikezawa, Z. (1998) Plant defense-related enzymes as latex antigens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101** (3), 379.
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, Ch., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., Ishii, Sh. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 25328.
- Zhu, A., Wang, Z.K., Beavis, R. (1998) Structural studies of a N-acetylgalactosaminidase: Effect of glycosylation on the level of expression, secretion efficiency, and enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **352**, 1.

ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
Con A	Concanavalina A
DAB	3,3' -diaminobenzidina-HCl
CD	Dicroísmo circular
DO	Densidad óptica
DEAE-Celulosa	Dietilaminoetil-Celulosa
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas
Fc RI	Receptor de alta afinidad del fragmento Fc de IgE
GAM-HRP	Anticuerpo de cabra frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa
HLA	Antígenos de histocompatibilidad de leucocitos humanos
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropiltiogalactósido
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de desorción ionización asistida por láser en matriz-tiempo de vuelo
Man	Manosa
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mOle e 1	Forma mutante del alérgeno Ole e 1
Mops	Ácido 3-(N-morfolin) propano sulfónico
nOle e 1	Forma natural, aislada del polen, del alérgeno Ole e 1
nOle e 9	Forma natural, aislada del polen, del alérgeno Ole e 9
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LTPs	Proteínas transferidoras de lípidos
OPD	o-fenilendiamina
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de p-nitrofenilmetilsulfonilo
PNGasa F	Péptido-N-glicosidasa F
RNasa	Ribonucleasa
rOle e 1	Forma recombinante del alérgeno Ole e 1

rOle e 9	Forma recombinante del alérgeno Ole e 9
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
SSC	Solución de cloruro sódico y citrato sódico
TFA	Ácido trifluoracético
Tm	Temperatura de fusión
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano